Pêches et Océans | Fisheries and Oceans

RAPPORT DE PROJET

Direction des services économiques et de développement
Région du Québec

Canada

MINISTÈRE DES PÊCHES ET DES OCÉANS
Région du Québec
Division du développement

RAPPORT 24

DÉNATURATION PROTÉIQUE ET OPACITÉ DE LA MORUE LÉGÈREMENT SALÉE-SÉCHÉE DU TYPE "GASPE CURED"

Ce rapport a été produit par une firme de consultants et financé en tout ou en partie par la Direction des opérations, région du Québec. Les vues et conclusions exprimées dans ce document sont celles du contractant et ne représentent pas nécessairement celles du Ministère.

RESPONSABLE DU PROJET: Clément Villeneuve TÉL.: (418) 648-4527

CONTRACTANT (adresse): C.R.E.N. (Pomerleau et Picard)
Cité universitaire
Ste-Foy (Québec)
G1K 7P4

Ce rapport ne peut être cité sans l'approbation du directeur de la Direction.

1 9 8 7

(c) Ministre des Approvisionnements et Services Canada - 1986
Numéro de catalogue FS 67-2/1-24 F
ISBN 0-662-93977-8

Publié par:

Ministère des Pêches et des Océans
Division du développement

Gare maritime Champlain
901, Cap-Diamant
C.P. 15500
Québec (Québec)
G1K 7Y7

REMERCIEMENTS

Nous remercions monsieur Léo Nicolas, de l'usine POISSON SALÉ GASPÉSIEN de Grande-Rivière, d'avoir bien voulu collaborer à la réalisation de ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

Page

LISTE DES TABLEAUX iii

LISTE DES FIGURES iv

LISTE DES SCHÉMAS v

RÉSUMÉ vi

1 INTRODUCTION 1

A) Dénaturation des protéines 1

1. Extraction des protéines 1
2. Dosage des protéines 15
3. Identification des protéines et de ses fractions 20

B) Opacité 27

1. La densité 27
2. Les fibres optiques 27
3. La transmittance interne 29

2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL 35

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION 40

4 CONCLUSION 55

BIBLIOGRAPHIE 58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1	Classification des protéines de filet de poisson selon leur solubilité	6
2	Description sommaire des expérimentations portant sur l'évaluation de la dénaturation protéique	9
3	Comparaison de différentes méthodes d'analyse	16
4	Comparaison de trois méthodes de dosage des protéines dans des filets de poisson (Swiniarska, 1973)	19
5	Évaluation du potentiel d'absorption à 280 nm de quelques solutions	40
6	Effet du NaCl et de l'antimousse contenus dans la solution d'extraction sur les mesures obtenus par Biuret et Lowry	41
7	Quelques caractéristiques de la morue pendant sa transformation en "Gaspe Cure"	44
8	Comparaison de deux modes d'agitation durant l'extraction des protéines de la chair de morue à 23 C	47
9	Dosage des protéines de "Gaspe Cure" par plusieurs méthodes d'analyse	49
10	Concentration des constituants protéiques contenus dans des extraits de "Gaspe Cure" mesurée par diverses méthodes d'analyse	50

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1	Électrophérogramme (a) d'extrait (0,6 M NaCl) de filet de morue fraîche et (b) du résidu de l'extraction (0,1 M NaCl) de morue décongelée après un an et demi d'entreposage à -15° C (Laird, 1981).....	4
2	Influence du pH sur l'extractabilité des protéines de morue par divers sels de chlorure après 24 heures à 4 C (Kokodzïojska, 1980)	11
3	Réduction des protéines solubles dans la morue fortement salée au cours d'un entreposage à la température de la pièce (Beatty, 1958)	12
4	Appareil de mesure de la densité optique de filet de poisson cru (Love, 1962a)	13
5	Changements des protéines d'un filet de poisson congelé (Sikorski, 1979)	14
6	Relation entre la turbidité et le contenu protéique du muscle de poisson (Umemoto, 1979)	21
7	Électrophérogramme de mélange de morue (Gadus Morhua) et de merlan noir (Pollachius virens) (Hume, 1980)	23
8	Diagramme de la sonde à fibre optique MRI (MacDougall, 1980)	28
9	Relation entre la valeur de la sonde à fibre optique et le coefficient de diffusion de la lumière Sy pour une coupe de boeuf foncé (Sy 0,11), normal (0,11 Sy 0,18) et pâle (Sy 0,2) (MacDougall, 1980)	30
10	Description des mesures impliquées par l'application de la théorie de Kubelka et Munk (1931) sur la translucidité (Francis, 1975)	32
11	Relation de l'indice du jaune en fonction (A) de la teneur en matière sèche et (B) de la teneur en eau de la chair durant la transformation du "Gaspe Cure"	46

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma		Page
1	Procédure expérimentale	36
2	Traitement de l'échantillon au laboratoire	37
3	Synthèse des modes d'extraction de protéines exercées durant les travaux de laboratoire et du traitement de l'extrait	45
4	Répartition de la matière azotée du "Gaspe Cure" ...	54
5	Protocole expérimental recommandé	57

RÉSUMÉ

Le produit "Gaspé Cured", typique de la région gaspésienne, se caractérise par sa couleur ambrée et une certaine translucidité.

Peu de recherches ont été réalisées jusqu'ici pour comprendre cette transformation caractéristique régionale. À partir de l'hypothèse qu'il existe une certaine relation entre la dénaturation des protéines et les caractéristiques du type "Gaspé Cured", nous avons procédé à l'évaluation des différentes méthodes d'analyse protéique afin de recommander celle qui corresponde le mieux au produit. À la lumière des résultats obtenus, il est possible que la couleur et la translucidité du produit dépendent du fractionnement des protéines fibrillaires.

Nous recommandons l'établissement d'une technique standard d'analyse protéique du poisson salé.

1. INTRODUCTION

Lors du procédé de fabrication de la morue légèrement salée séchée de type Gaspé Cure, plusieurs modifications d'ordre chimique, physique, biochimique et microbiologique interviennent au niveau de la chair du produit. Ces modifications ont des impacts plus ou moins importants qui peuvent grandement influencer le classement final du produit.

L'apparence du produit demeure un critère important lors de sa classification finale. La couleur jaune ambrée et l'aspect translucide du produit, même s'ils sont les deux paramètres les plus recherchés, sont et demeurent deux phénomènes très mal expliqués.

Pomerleau et Picard (1985) après considération des principaux paramètres caractérisant ce produit, soulèvent l'hypothèse que la couleur et la translucidité, pourraient être reliés à la dénaturation des protéines. Certaines notions fondamentales retrouvées dans la littérature s'avèrent importantes à l'élaboration du déroulement expérimental et serviront de préambule à la mise en situation. Le présent travail porte sur trois volets du traitement des protéines en laboratoire permettant une meilleure connaissance du produit:

1 - l'extraction
2 - le dosage
3 - l'identification ou caractérisation

A - Dénaturation des protéines

1. Extraction des protéines

La composition du muscle de morue fraîche en protéines, en lipides, en eau et en cendres sont respectivement 18,42%, 0,42%,

80,90% et 0,92% (Jhaveri, 1984). Après transformation, la proportion de protéine augmente aux environs de 36 à 41% selon la teneur en eau du produit fini (Pomerleau et Picard, 1985). Les protéines constituent donc une composante importante de la morue légèrement salée séchée de type Gaspé Cure.

Les protéines sont principalement divisées en trois classes:

a) sarcoplasmes ou globulaire (myogène)

Elles constituent 15 à 20%, selon l'espèce, du total des protéines solubles en solution non-saturée. En général, leur poids moléculaire varie de 40,000 à 70,000 daltons (grammes/mole). Le myogène représente principalement les protéines fonctionnelles c'est-à-dire les enzymes cellulaires.

b) fibrillaires

Elles représentent près de 60 à 80% des protéines solubles dans les solutions salines à forte force ionique ($0,6 < \mu < 0,9$). Leur poids moléculaire se situe de 4×10^5 à 6×10^5 daltons. Leur haut poids moléculaire confère aux extraits une légère turbidité et une certaine viscosité (Warrier, 1975). Ce groupe joue un rôle crucial sur les qualités texturales de la chair. De plus, il contribue aux contractions du muscle. Ces mouvements sont permis par certaines protéines disposées en bande et par des associations complexes de protéines, en l'occurence, l'actine, la myosine, la tropomyosine, etc.

Les protéines myofibrillaires sont reconnues pour leur plasticité et leur habileté à former des gels. Les changements dans la texture d'un filet sont surtout attribuables aux réactions imputées à ce groupe de protéines.

c) Stomatiques

Elles constituent les protéines de soutien (collagène, élastine, etc...) difficilement extractibles à force ionique faible ou modérée. Sur le plan quantitatif, ces protéines sont peu importantes dans le muscle du poisson: environ 3% comparativement à 20% dans les autres types de muscle strié, c'est-à-dire les viandes rouges (Cheftel, 1976). Cependant, cet état explique la fragilité du tissu de chair rouge vis-à-vis le peu de résistance à la déformation, et sa tendreté.

Dans le muscle de poisson, on ne retrouve que quelques-unes des protéines constituant ces groupes. Un patron électrophorétique (figure 1) présenté par Laird (1981) illustre les types de protéines du muscle de morue. La myosine de type A représente, d'après la composition en acides aminés (constituants primaires des protéines), 40% du total des protéines solubles (Warrier, 1975). Cette protéine est plus instable dans les tissus marins que dans les muscles des mammifères. Ceci s'explique par la composition de la myosine A (séquence des acides aminés, ramification) qui diffère dans les deux cas (Ellis, 1959).

Dans le muscle, l'actine est réunie à la myosine et forme un complexe actomyosine, appelé myosine B. L'actine représente 15 à 20% du complexe (Warrier, 1975) et possède un poids moléculaire de 42 000 daltons. De plus, cette protéine qui est très stable, n'est pas retrouvée sous forme de sous-unités.

La myosine, principal constituant de la myosine B, possède un poids moléculaire de 500 000 daltons. Composé moins stable que l'actine, on la retrouve en deux sous-unités dites chaînes lourdes de 200 000 daltons et chaînes légères de 15 000, 18 000 et 25 000 daltons (Laird, 1981).

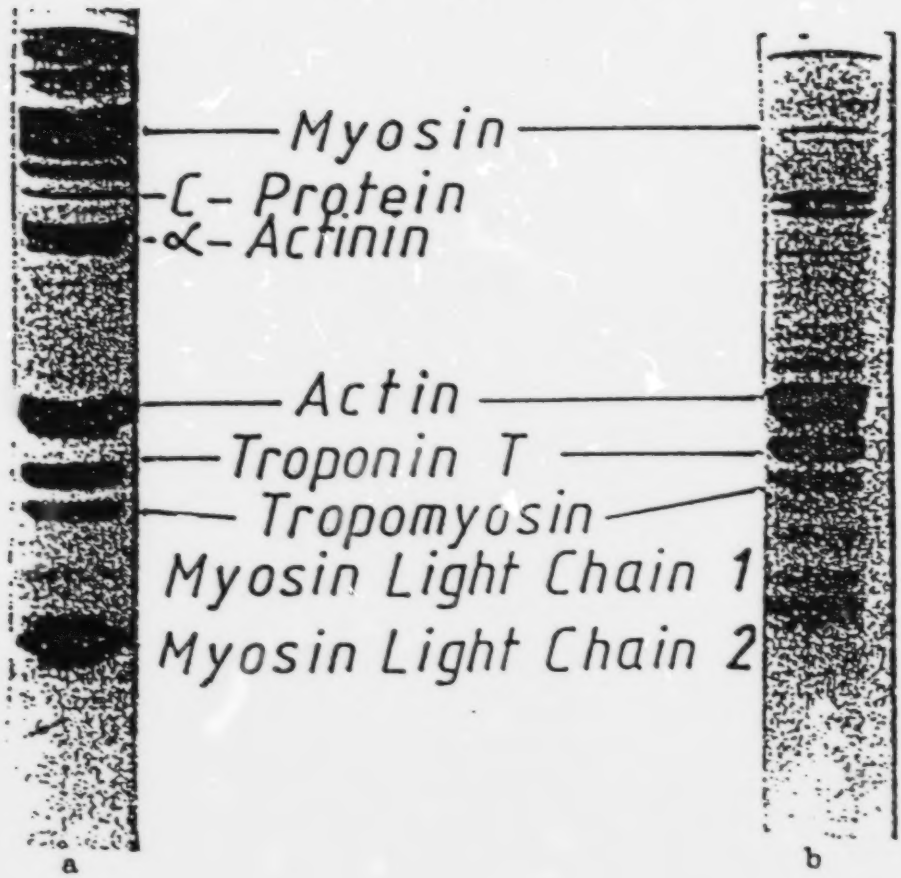

Figure 1. Electrophérogramme (a) d'extrait (0,6 M NaCl) de filet de morue fraîche et (b) du résidu de l'extraction 10,1 M NaCl) de morue décongelée après un an et demi d'entreposage à -15°C (Laird, 1981).

La tropomyosine, protéine contractile, constitue environ 3% du muscle de la morue et on lui attribue un rôle prépondérant au niveau du mécanisme de la contraction musculaire.

La classification des protéines peut s'effectuer à partir de leurs propriétés fonctionnelles et ce sont certaines de ces propriétés qui en permettent l'isolement (De Man, 1976):

a) stabilité de l'émulsion
b) propriété moussante
c) gélification
d) capacité de rétention d'eau
e) propriété mouillante (gonflement)
f) solubilité

Deux de ces propriétés retiennent particulièrement l'attention; la capacité de rétention d'eau et la solubilité. La capacité de rétention d'eau (CRE) du tissu dépend de la structure et de la composition en acides aminés des protéines musculaires. Hamm (1960) mentionne que les protéines de structure (myosine, actine, tropomyosine) sont responsables d'environ 70% de la CRE du muscle.

Par leur capacité de polarisation et leurs charges électrostatiques, certains groupes chimiques sont hydrophiles c'est-à-dire qu'ils possèdent une certaine affinité pour l'eau (Warrier, 1975; Thomas, 1946), notamment:

a) groupe amino
b) groupe carboxyle
c) groupe hydroxyle
d) groupe sulfhydryle

Ces groupements confèrent aux protéines leur capacité de rétention d'eau.

Hamm (1960) observe qu'à certaines concentrations l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) permet l'augmentation de la CRE de la chair. Il attribue ce changement principalement à l'effet de l'ion Cl^- puisque les essais avec l'acétate de sodium ont prouvé que ce sel d'acide faible n'affecte pas la CRE. L'emploi du pyrophosphate, du triphosphate et de l'hexamétaphosphate accroît l'extractibilité des protéines fibrillaires. En général, les phosphates dissocient le complexe actomyosine en actine et en myosine provoquant ainsi, une hausse de la CRE des viandes (Warrier, 1975).

En se basant sur leur propriété de solubilité, les protéines des poissons peuvent être classées en trois groupes, comme l'indique le tableau 1.

Tableau 1: Classification des protéines du filet de poisson selon leur solubilité

Force ionique pour leur solubilité à pH 7-7,5	Nom du groupe	Localisation et description
0	Sarcoplasmique (myogène)	Liquide cellulaire myoglobine enzymes
$0,36 < \mu < 0,9$*	Fibrillaire	Myofibrille élément de contraction
insoluble	Stromatique	Fibre de soutien paroi cellulaire

* 0,3 à 1,0 selon Shenouds (1980)

La solubilité est une propriété grandement exploitée par les auteurs qui étudient les protéines puisqu'elle permet de les extraire du milieu d'origine, étape essentielle et critique avant l'analyse d'une caractéristique ou d'un comportement particulier d'une protéine.

La force ionique de la solution d'extraction étroitement reliée à la concentration en sel, intervient sur la charge des protéines en introduisant par les ions anions et cations des forces électrostatiques. Dyer (1950) a évalué l'effet de différents sels sur leur capacité à solubiliser les protéines du tissu musculaire de la morue. Ces résultats démontrent que pour une concentration d'un normal (1 N), le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et l'iodure de potassium (KI), permettent une extraction des protéines solubles efficace à 91%.

La dénaturation des protéines se définit comme étant une ou des modifications d'ordre chimique, physique et biologique de leurs structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires. Les paramètres servant habituellement à mesurer l'étendue de la dénaturation sont les suivants:

a) poids moléculaire
b) constante de diffusion
c) coefficient d'absorption
d) viscosité
e) rotation spécifique
f) mobilité électrophorétique
g) sédimentation
h) solubilité

Plusieurs moyens permettent d'évaluer le niveau d'alteration des protéines. La plupart des méthodes procèdent d'abord par une extraction des matières protéiques solubles à l'aide d'une agitation vigoureuse. Selon le type d'élément mesuré, les solutés en dilution et les manipulations diffèrent d'un protocole à l'autre. Le tableau 2

démontre la grande variabilité existant dans ce genre d'expérimentation.

Une variation judicieuse de la force ionique permet de séparer certaines protéines de leur milieu d'extraction. Certains auteurs procèdent à une double extraction. Poulter (1985) isole du muscle les protéines solubles par un broyage en présence de chlorure de potassium (KCl) 1M (mole/litre). Les protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques passent alors en solution. Une seconde extraction sur une autre portion de l'échantillon à analyser utilisant une solution tampon phosphate de force ionique de 0,05 soutire de la chair les protéines sarcoplasmiques seulement. Sikorski (1975) suit la même procédure sauf qu'il emploie d'abord une solution de 0,9 M de chlorure de sodium (NaCl) à pH 7,5. De l'eau à pH 7,5 suffit pour une seconde extraction. D'autres travaux fragmentent l'extrait en une plus grande quantité d'unités. L'étude de Lim (1984) en est un exemple très récent. Son extraction sélective s'élabore en quatre volets:

a) extraction des protéines solubles dans l'eau déionisée
b) extraction des protéines en solution saline
c) extraction des protéines résiduelles solubilisables à l'aide de dissociant tel le mercaptoéthanol
d) extraction des protéines dites inextractables par l'action enzymatique.

Certains facteurs limitent et contrôlent l'efficacité de l'extraction. Shenouda (1980) en rapporte quelques-uns:

a) type de sel
b) concentration des ions divalents
c) force ionique
d) pH
e) capacité tampon
f) durée d'extraction
g) vitesse de broyage

TABLEAU 2: Description sommaire des expérimentations portant sur l'évaluation de la dénaturation protéique

Auteur	Poids de chair (g)	Profil de l'extraction										Elément dosé
		Solution			Broyage	(Blender)	Repos	Centrifugation		Dilution		
		Conc.	Sel	pH	Révolution rpm	temps (sec)	Temps (min)	X g	Temps (min)	Solvent	Rapport	
Dyer (1980)	45	5% 0,02 M	NaCl $NaHCO_3$	7-7,5	-	3 à 5 min	-	2000	30	Eau distillée	5:50	-Myosine -Protéines solubles totales
Kolakowski (1974)	100	1% 31%	T.C.A. T.C.A.	-	1° 10 000 2° 10 000 3° 3 000	30 30 -	5 5 30	-	-	-	-	-Peptides
Ironside (1958)	1,4	5%	NaCl	7,75	2 200	60	0	2300	30	T.C.A. 15%	-	-Protéines solubles totales -N-soluble non prot.
Picard (non publié)	5	0,6 M	KCl	-	-	.10 .10 .10	15 sec 15 sec (filtration) 1			-	-	-Protéines solubles totales
Swiniarska (1973)	5	5% 0,02 M	NaCl $NAHCO_3$	7,72	3 000	15	60	4000	20	-	-	-Protéines solubles totales

La figure 2, tirée de l'étude de Kolodziejska (1980), réflète l'implication du sodium dans les extractions impliquant des sels de chlorure. Ces résultats démontrent qu'à l'usage chlorure de sodium (NaCl), lors de la salaison, est relié une solubilisation de protéines. Celle-ci est supérieure en présence du chlorure de sodium (NaCl) et moindre avec l'utilisation du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et chlorure de calcium ($CaCl_2$) pour un même pH.

Van Klaveren (1965) souligne qu'en plus du sel, la température modifie l'arrangement structural des protéines conduisant à une insolubilisation de celles-ci. Ces résultats confirment ceux de Beatty (1958) qui démontre qu'au cours de la salaison, la quantité de protéines solubles de la morue décroît (figure 3).

L'évaluation de la dénaturation des protéines peut se mesurer par leur solubilité. Cependant, il existe un appareil capable de vérifier, par le biais de l'opacité, l'état de dénaturation des protéines (Love, 1962a). Cet instrument permet de détecter des différences marquées dans l'opacité de filets congelés et frais que Ironside (1958) met en évidence simplement par une mesure des protéines solubles en solution 5% de NaCl. Love (1970b) ajoute que l'altération des protéines s'associe nécessairement à un accroissement de l'opacité de la morue (Gadus Morhus). La figure 4 présente l'appareil élaboré par Love (1962a).

L'application de cette méthode d'analyse consiste en une homogénéisation pendant 30 secondes de 200 5 mg de chair dans 20 mL d'une solution 1% de formaldéhyde refroidie à 6 C (Love, 1962b). La formaldéhyde est incorporée à l'eau afin qu'au cours de la rupture des cellules musculaires, les protéines solubles libérées coagulent (Sikorski, 1975). Des recherches confirment que la formaldéhyde et la diméthylamine sont générées par la dégradation de l'oxyde de triméthylamine durant le vieillissement d'un filet. La formaldéhyde est reconnue comme un facteur induisant des modifications des protéines (Sikorski, 1979). La figure 5 montre les diverses voies chimiques impliquées au cours de la dégradation des protéines.

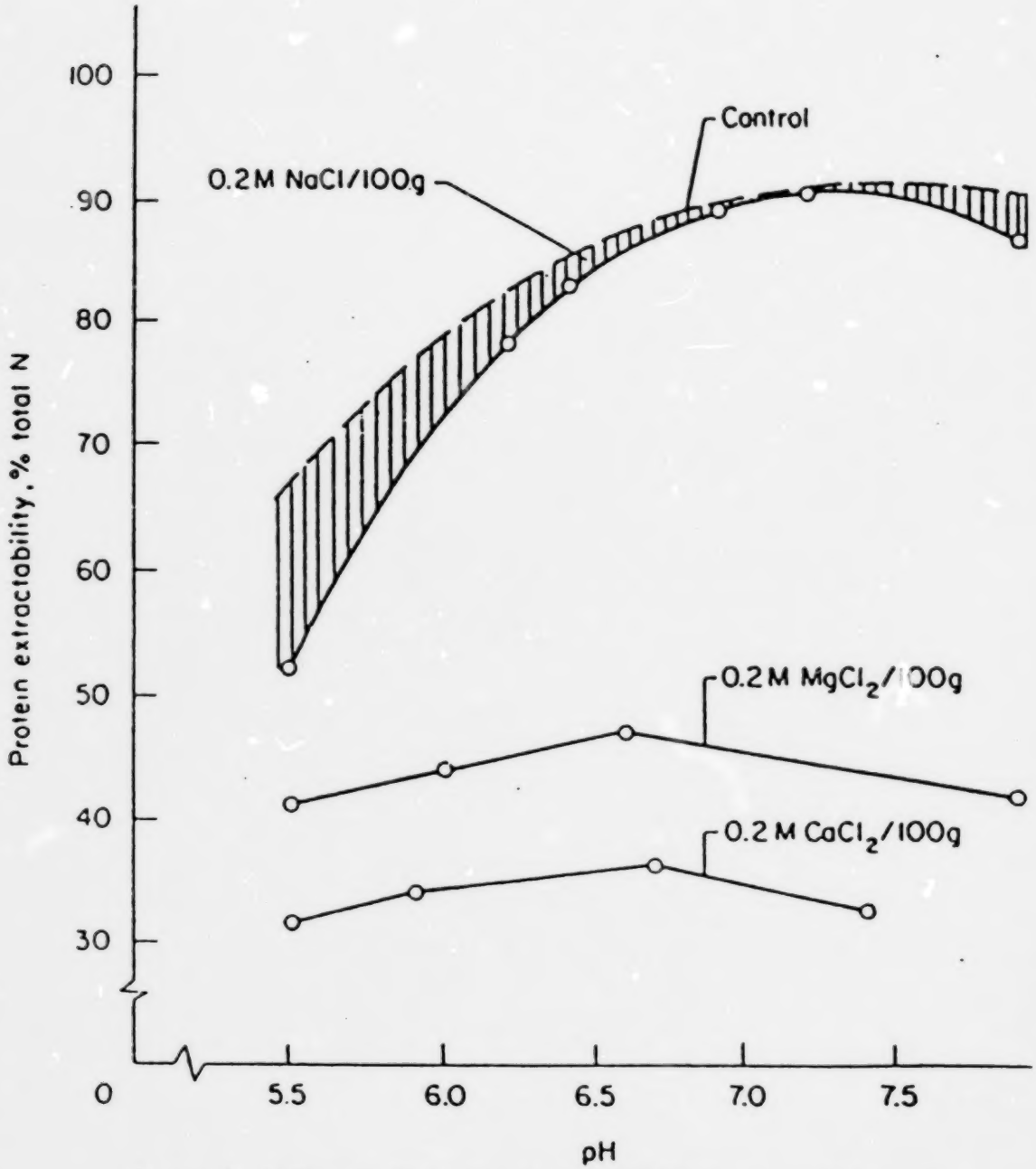

Figure 2. Influence du pH sur l'extractabilité des protéines de morue par divers sels de chlorure après 24 heures à 4°C (Kolodziejska, 1980).

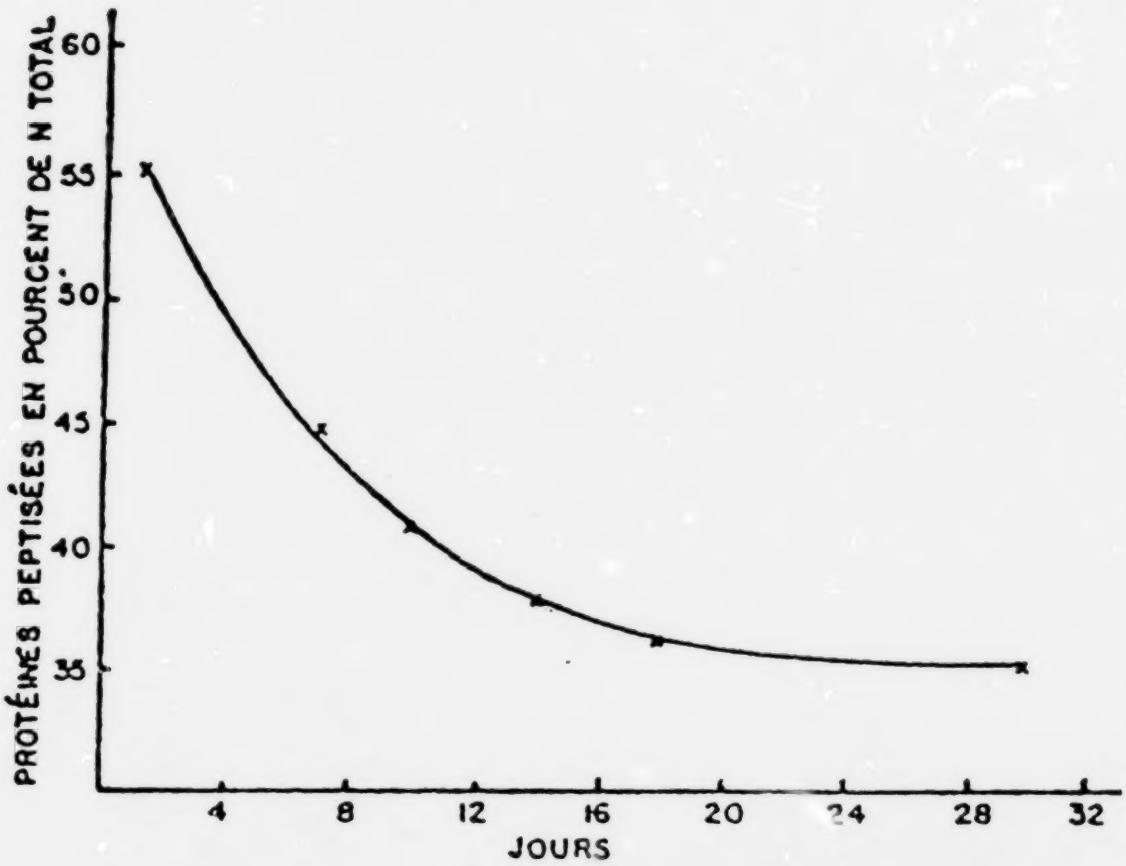

Figure 3. Réduction des protéines solubles dans la morue fortement salée au cours d'un entreposage à la température de la pièce (Beatty, 1958).

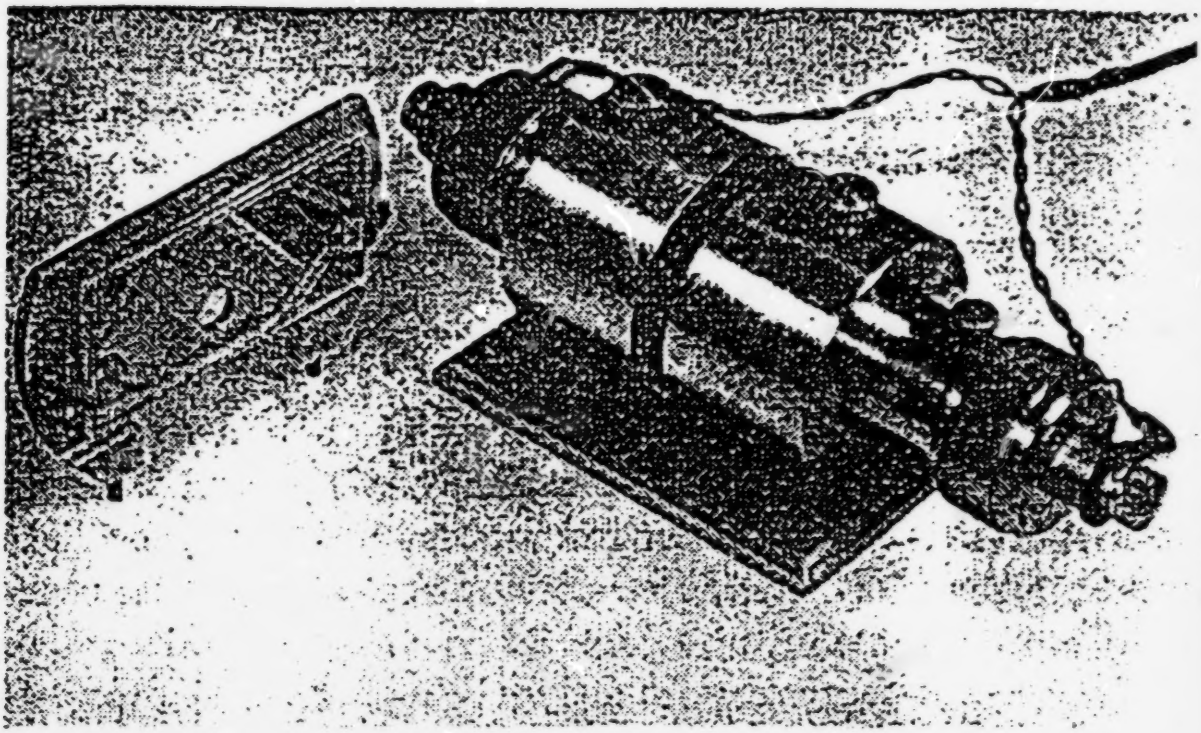

Figure 4. Appareil de mesure de la densité optique du poisson cru (Love, 1962a).

A gauche: support de métal pour l'échantillon de poisson contenu entre deux plaques de verre.

A droite: montage optique. Un des côtés de l'appareil contient une ampoule 6-V, l'autre une cellule photoélectrique reliée à un galvanomètre (non photographié) calibré en unité d'extinction (log I_0/I).

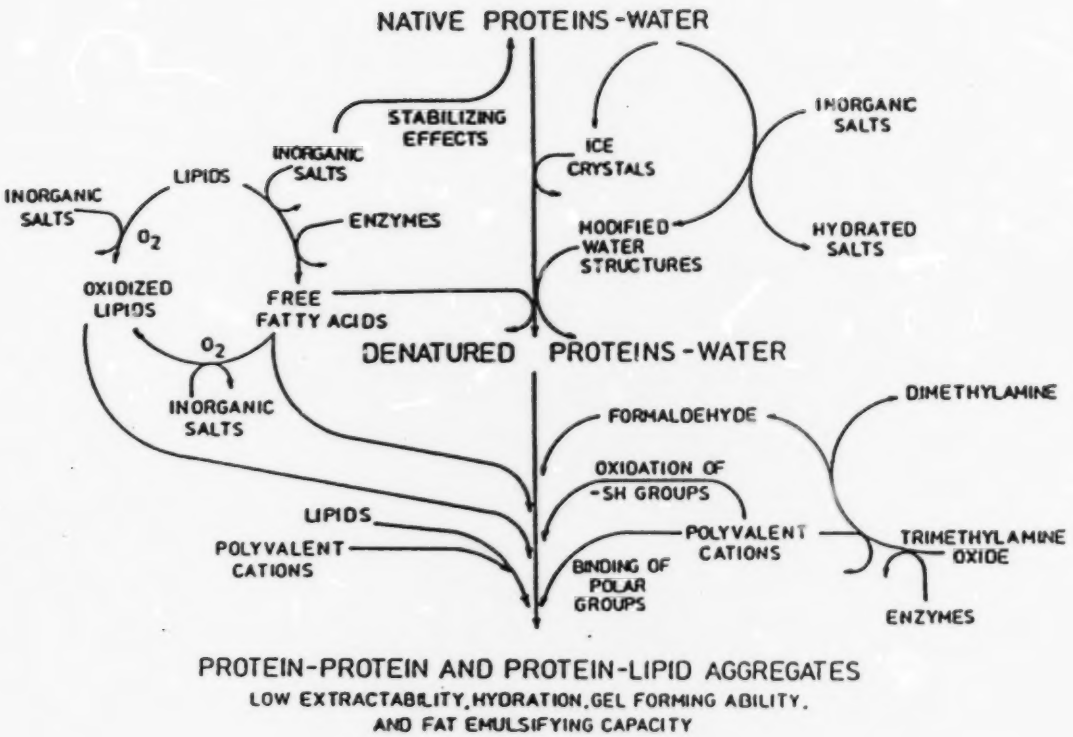

Figure 5. Changements des protéines d'un filet de poisson congelé (Sikorski, 1979).

2. Dosage des protéines

Plusieurs méthodes existent à l'heure actuelle pour évaluer la concentration protéique d'un échantillon. Certaines méthodes font appel à la colorimétrie (Gornall, 1949; Lowry, 1951); d'autres à la turbidimétrie (Umemoto, 1978; Colowick, 1957; Kuramoto, 1959). Quelques auteurs mesurent l'importance des protéines dissoutes par l'intermédiaire de l'absorbance de 210 à 280 nm (Ohnishi, 1979; Thorne, 1978). Une autre technique consiste à la digestion de l'échantillon pour en mesurer, par titration du distillat, le contenu en azote total. Cette dernière méthode, Kjeldahl, constitue une mesure de référence universelle (Thorne, 1978; Swiniarsk, 1973).

Les champs d'application de ces méthodes sont variés. Le protocole associé à chacune d'entre elles diffère grandement d'une à l'autre. La sensibilité, la spécificité, la rapidité d'exécution, la précision, sont quelques-uns des critères de sélection qui influencent le choix d'une analyse. Le tableau 3 nous donne une comparaison sommaire des principales méthodes utilisées.

Les tests de colorimétrie sont les plus couramment employés.

La réaction de Biuret est caractérisée par une coloration violette qui apparait lorsqu'on ajoute quelques gouttes d'une solution de sulfate de cuivre à une solution protéique fortement alcanisée. Le complexe formé est un dérivé cupro-alcalin, l'ion cuprammonium (Thomas, 1946; Thorne, 1978). Cette méthode est réputée pour sa grande spécificité en regard du contenu protéique d'une solution.

Les résultats de Turgut (1979) vérifient les effets découlant des traitements préalables de l'échantillon, bien que les données de Torten et Whitaker (1964) prouvent l'indépendance de la nature des protéines sur la méthode. L'intensité de la coloration décroît considérablement si l'extrait de protéines est analysé après un entreposage

TABLEAU 3. Comparaison de différentes méthodes d'analyse (Anon, 1982)

Méthode	Principe	Sensibilité (µg)	Spécificité des protéines	Effet du type de protéines	Niveau de difficulté
Kjeldahl (micro)	Evaluation de l'azote ammoniacal	1	Bonne	Faible	Complexe
Biuret	Evaluation des liens peptidiques (tripeptide ou plus)	100	Bonne	Faible	Légèrement exigente
Lowry	Réaction avec les acides aminés (tyrosine et tryptophane principalement	1	Modérée	Importante	Légèrement exigente
Absorbance a 210 nm	Evaluation du nombre de liens peptidiques	0,5	Bonne	Faible	Très simple
Absorbance à 280 nm	Evaluation de la tyrosine et du tryptophane	10	Modérée	Importante	Très simple
Turbidimétrie	Evaluation des protéines par précipitation	100	Faible	Importante	Simple

d'une journée à 3°C. Turgut (1979) attribue ces modifications à l'action enzymatiques. Shenouds (1980) décrit la protéolyse comme étant une forme de dénaturation protéique qui résulte en un changement de conformation de la protéine. Cette activité induit finalement des bris du lien peptidique donc la présence est capitale dans la formation du complexe coloré.

La méthode de Lowry permet l'évaluation de la concentration en protéines par la formation d'un complexe coloré impliquant certains acides aminés aromatiques: la tyrosine et le tryptophane. Lowry (1951) propose que le déroulement de la réaction s'effectue en deux étapes:

1 - Réaction des protéines avec le cuivre dans un milieu alcalin
2 - Réduction du réactif phosphomolybdique-phosphotungstique par le complexe protéine cuivre.

Cette deuxième méthode de dosage présente comme avantage d'être beaucoup plus sensible que le test de Biuret. Cependant, elle est beaucoup moins spécifique puisque le résultat est étroitement lié à la proportion des deux acides aminés aromatiques dans les protéines analysées (Lowry, 1951). Certaines interférences influencent les résultats de ces tests. Bensadoun (1976) mentionne que l'emploi de l'acide trichloroacétique (T.C.A.) et de détergents, Triton X-100 par exemple, se traduit par une altération de l'intensité de la coloration. Thorne (1978) rappelle que certains ions notamment K^+ et d'autres métaux divalents, entrainent la formation d'un précipité tandis que Hg^{+2} diminue l'intensité de la coloration du complexe. L'usage d'un tampon Tris et la présence de sucrose ou de glycérol dans la solution de protéines diminuent l'intensité de la coloration lors des réactions de Biuret et de Lowry. Ces composés influencent également, de la même façon, l'échantillon de référence pour la méthode de Lowry.

L'analyse des protéines par la méthode Kjeldahl ne subit pas d'interférence par les produits précités. Cette méthode se veut une mesure de la teneur en azote organique. Elle consiste à l'addition

d'acide sulfurique à la matière organique en présence d'un catalyseur (HgO) entrainant une réaction d'oxydation stimulée par la chaleur. L'azote se transforme en ammoniaque en présence du catalyseur, en l'occurrence le mercure. Une distillation du résidu de la digestion en présence de l'hydroxyde de sodium (NaOH) libère l'ammoniaque, subséquemment retenu par solubilisation dans une trappe d'acide borique contenant l'indicateur. Finalement la quantité d'ammoniaque est dosée par titrage jusqu'au point de virage par l'addition d'acide chloridrique (HCl) (Anon, 1982). Quoique cette méthode soit employée à titre de méthode universelle, elle surestime le contenu protéique, puisque le dosage représente l'azote total, donc pas nécessairement d'origine protéique.

Les travaux de Swiniarska (1973) comparent les deux méthodes colorimétriques à la méthode de référence de microkjeldahl. Le tableau 2 contient les étapes de la technique d'extraction employée par l'auteur. Au tableau 4 se trouvent quelques-uns des résultats de diverses méthodes d'analyse des protéines de poissons.

De par leur structure, les protéines absorbent à des longueurs d'onde près de l'ultraviolet qui dépend de certains constituants de la molécule. Le tryptophane et la tyrosine absorbent plus spécifiquement à 275-280 nm. La contribution des acides nucléiques et de la phénylalanine a lieu dans la région de 260 nm tandis que l'histidine, la méthionine, la cystéine et la cystine absorbent entre 225 et 240 nm (Thorne, 1978).

Les analyses de turbidimétrie permettent de quantifier la teneur en protéines d'une solution. La majorité de ces tests s'effectue en deux étapes, c'est-à-dire une extraction à laquelle succède une précipitation des protéines de l'extrait par une dilution soit en milieu d'acide trichloroacétique (T.C.A.) (Umemoto, 1978), soit en présence de sel (Anon, 1982) ou soit par une hausse de la température, ce qui entraine une coagulation (Van Klaveren, 1965). Umemoto (1978) détermine une relation entre la turbidimétrie et la concentration de

TABLEAU 4. Comparaison de trois méthodes de dosage des protéines dans des filets de poissons*

Méthode de dosage	Morue			Hareng		
	$\bar{X}$	σ[b]	c.v.[c]	$\bar{X}$	σ	c.v.
Lowry	2,83	0,028	0,99	2,93	0,019	0,65
Biuret	2,75	0,063	2,29	2,93	0,071	2,42
Microkjeldahl	2,71	0,031	1,14	2,73	0,034	1,24

* Les résultats sont exprimés en mg de protéine/mL d'extrait

a: moyenne

b: écart-type

c: coefficient de variation de la méthode

protéines de poisson. La figure 6 montre la relation que l'auteur décrit par l'équation (1).

$$X = 0{,}065 + 16{,}2602\ Y \qquad \text{(Equation 1)}$$

où X = concentration en azote protéique (µg/mL)
Y = densité optique à 345 nm

L'estimation du contenu protéique par les méthodes colorimétriques requiert l'usage d'une référence dont le choix est influencé par la nature de la matière analysée. Lors d'études évaluant la teneur protéique de différents produits, Layne (1957), Thorne (1978), Venugopl (1981), Rehbein (1984) prônent l'emploi de l'albumine de sérum bovin (A.S.B.).

Kolakowski (1974) mesure la concentration en peptides par densité optique à 570 nm. Cette méthode indirecte a comme référence la batracine B. Elle convient à l'observation du développement de la protéolyse dans la chair de morue durant l'entreposage.

3. Identification des protéines et de ses fractions

La différenciation des protéines, des peptides et des polypeptides exige des manipulations longues, sophistiquées et onéreuses. Diverses caractéristiques des macromolécules, leur dimension, leur charge et leur poids moléculaire en permettent la séparation. Ces techniques de séparation sont:

a) électrophorèse
b) électrofocalisation
c) ultracentrifugation
d) calorimétrie différentielle (DSC)
e) chromatographie sur colonne (HPLC)

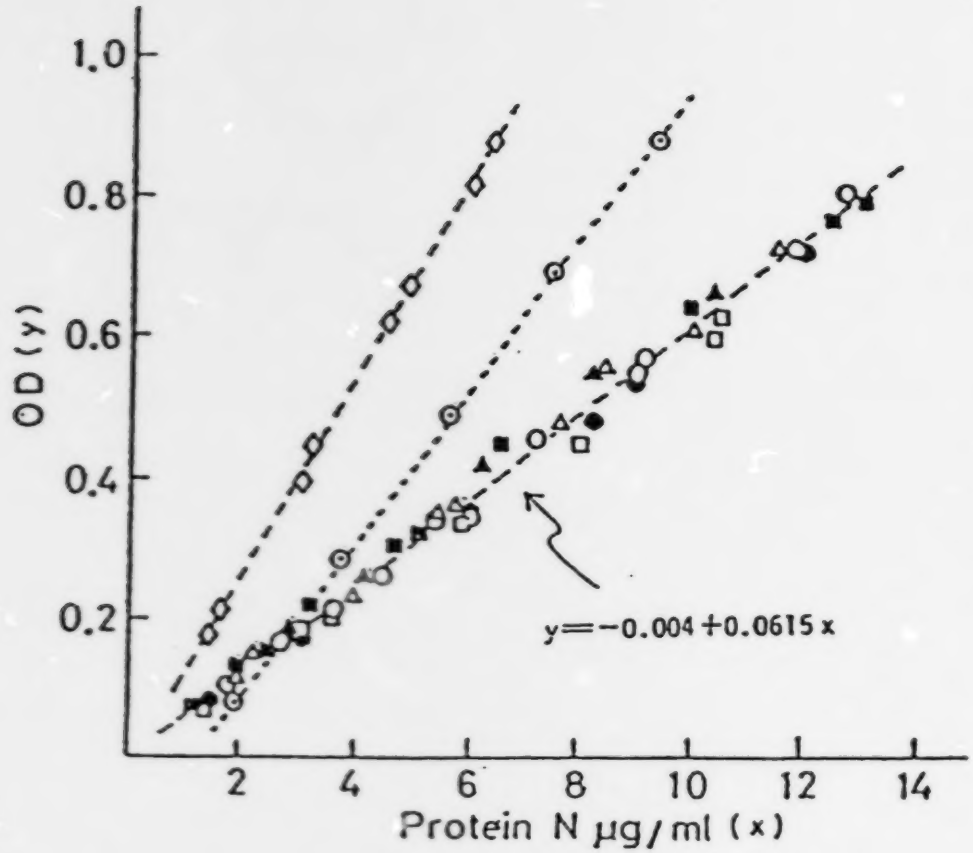

Figure 6. Relation entre la turbidité et le contenu protéique du muscle de poisson (Umemoto, 1978). Les traductions françaises des espèces sont données dans le document de Leim (1966).

- ○ Poisson plat (Platichtys stellatus pallas)
- □ Castagnole de madère (Taractes princeps)
- △ Espadon (Xiphias gladius linnaeus)
- ▲ Sardine (Sardinops caerulea girard)
- ● Thon rouge (thunnus thynnus)
- ■ Thon ventru (Thunnus obesus)
- ◇ Albumine de serum
- ⊙ Albumine d'oeuf

L'électrophorèse sur gel est très utilisée pour la détection de fraudes lors de la vente au détail de produits marins frais et congelés. Certains caractères distinctifs des espèces, la forme générale du corps, la tête, les nageoires et les écailles sont absents ce qui permet de vendre ces produits sous des appellations qui ne correspondent pas toujours à leur nature exacte (Billon, 1979). Cette technique qui réfère aux protéines permet de caractériser l'espèce. Alvarez (1974) utilise cette méthode pour identifier les espèces utilisées pour la fabrication d'un produit commercial, les croquettes de poissons. Seki (1976) l'applique à certains produits cuits où l'actomyosine est dénaturée par les traitements thermiques, pour l'élaboration de certains produits commerciaux comme le kamaboko. Les résultats de Hume (1980) démontrent que l'électrophorèse sur gel offre la possibilité d'évaluer la proportion de mélange de poisson (figure 7).

Les protéines soumises à l'action d'un champ électrique se déplacent de façon différente selon leur charge et leur dimension. Un balayage par un densimètre du gel après la migration des protéines donne un spectre spécifique à chaque espèce (Billon, 1979).

La majorité des auteurs qui analysent les muscles de poissons de différentes espèces, travaillent avec des extraits contenant des protéines sarcoplasmiques, i.e. les protéines solubles dans l'eau et non pas celles solubles dans les solutions salines (Connell, 1953a, b; Billon, 1979; Hume, 1980, Laird, 1982). Cette procédure est expliquée par la grande spécificité selon l'espèce des protéines sarcoplasmiques (Hattala, 1978). Laird (1981) exécute des extractions sélectives de manière à retirer d'abord les protéines sarcoplasmiques puis les myofibrillaires sur deux filets, frais et décongelé (figure 1). Ainsi, il peut comparer les différentes fractions obtenues dans chacun des cas.

Certains auteurs séparent l'extrait par élution. Ce mode d'isolement consiste en un fractionnement de l'extrait qui circule par gravité dans un tube rempli de billes de dimension connue. Le temps

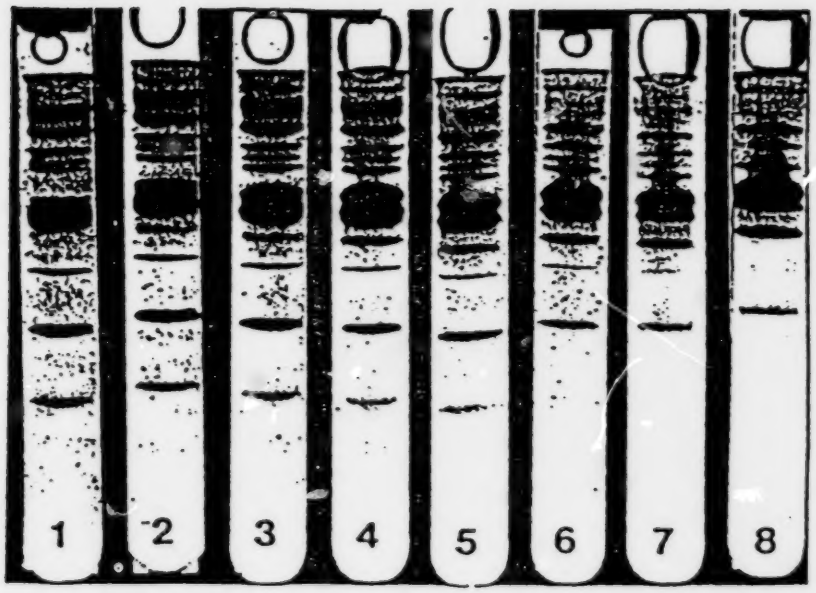

Figure 7. Electrophérogramme de mélange de morue et de merlan noir (Hume, 1980).

#	1	2	3	4	5	6	7	8
% morue	100	86	72	57	43	28	14	0
% merlan noir	0	14	28	43	57	72	86	100

requis pour le passage d'une protéine est influencé directement par sa forme et sa dimension. Une série de portions de la solution de protéines du poisson recueilli sont analysés dans la plupart des cas par absorption à 280 nm (Oshini, 1979; Lim, 1984). Ohnishi (1979) observe l'évolution des fractions protéiques contenues dans les portions d'extrait par électrophorèse, tandis que Lim (1984) préfère utiliser la fluorescence relative à 360/440 nm. Ce moyen technique qu'est la fluorescence, permet de détecter la formation de la base de Schiff étroitement associé à la réaction de Maillard (réaction de brunissement non enzymatique). Cette méthode, appliquée aux protéines, est facilement adaptable aux acides aminés à partir de quelques modifications de certains paramètres: le temps, le voltage, le tampon utilisé, etc. (Kolakowski, 1974).

La grande toxicité de l'acrylamide (cancérigène) a amené les chercheurs à développer de nouveaux gels. Podeszewski (1975) a mis au point un gel conçu à partir d'amidon hydrolysé de pommes de terre commerciales. Les conditions optimales de migration des protéines de poissons frais intéressent de plus en plus les chercheurs. Ils possèdent le double avantage d'être à la fois moins toxiques que l'acrylamide et de réduire le temps d'opération (Laird, 1982).

Une autre technique de séparation, l'électrophorèse exploite également la charge nette de la molécule sauf que la migration s'effectue dans un gradient de pH contrairement à l'électrophorèse où une différence de potentiel active le déplacement. A un point spécifique, la quantité de charges électropositives et électronégatives de la protéine sont égales. La charge globale de la protéine devient nulle et la floculation se produit. Ce précipité correspond au point isoélectrique. Chaque protéine possède un point isoélectrique spécifique ce qui permet une identification.

En général, les auteurs qui emploient cette méthode d'identification sur les tissus marins procèdent à l'extraction des protéines sarcoplasmiques pour leur grande spécificité (Lundstrom, 1979, 1980; Hamilton, 1982; Abrams, 1984). Abrams (1984) attribue à l'élec-

trofocalisation, des capacités à dépister les fraudes. La détection de l'espèce est efficace quand les spécimens se retrouvent à l'état frais. Selon ce chercheur, la technique est valable sur des chairs ou des mélanges qui ont subi un traitement thermique, en autant que la cuisson n'excède pas 60-70°C selon l'espèce. D'après cette étude, le poisson mariné se prêt mal à l'identification des espèces par électrofocalisation. Les gammes de pH régulièrement couvertes varient d'une expérience à l'autre. Cependant, Hamilton (1982) obtient des conditions optimales dans un gel d'agarose. Un gradient de pH de 5 à 8 unités permet une meilleure résolution car les protéines sarcoplasmiques forment de larges bandes distinctes.

Les travaux de Lundstrom (1983) montrent que l'identification de l'espèce par l'électrofocalisation peut être difficile et dépend de l'espèce de poisson. Seulement 6 des 14 experts ont identifié l'espèce à l'étude, le Monkfish (Lophius americanus).

L'ultracentrifugation permet la stratification d'une solution protéique. Cette technique sépare les protéines par poids moléculaire et établit les diagrammes de sédimentation. Ellis (1959) a ultracentrifugé un extrait salin de protéines de morue et les résultats indiquent la présence des 3 constituants majeurs. Cette méthode offre la possibilité de vérifier l'impact des changements occasionnés par la variation de certains paramètres tels que le pH et la concentration des ions sur les composantes de la solution ultracentrifugée.

Poulter (1985) procède à l'identification des protéines à l'aide d'un balayage par calorimétrie différentielle (Differential Scanning Calorimetry ou DSC). Son principe consiste à une mesure de l'énergie absorbée par un échantillon lors d'une élévation de la température ambiante. Un enregistrement de l'absorption de chaleur permet d'observer sur un thermogramme la dénaturation des divers constituants de l'échantillon. Les études déjà existantes portent surtout sur les viandes et révèlent que, dans la majorité des cas, les transitions distinctes correspondant à la dénaturation de la myosine et de l'actine se retrouvent aux environs de 60°C et 81°C

respectivement. Les résultats de Poulter (1985) montrent que la stabilité à la chaleur de la myosine et des protéines sarcoplasmiques diffèrent d'une espèce à l'autre chez les poissons. Cependant, la dénaturation de l'actine demeure à 73°C pour les trois espèces étudiées. Les essais sur du matériel congelé lui laissent croire que cette méthode est potentiellement intéressante afin de vérifier l'état de la dénaturation des protéines ainsi que pour la différentiation des espèces.

L'identification des espèces à partir des composantes protéiques est également réalisable par la chromatographie liquide de haute performance (High Performance Liquid Chromatography ou HPLC). Ashoor (1985) a mis au point cette méthode des extraits de protéines sarcoplasmiques de sept espèces dont la morue. Des équipements dispendieux sont requis pour ce genre d'expérience qui s'apparente étrangement à la distillation où le nombre de plateaux doit être élevé pour favoriser la séparation. Les données de Ashoor (1985) indiquent que les espèces peuvent facilement s'identifier en comparant les différents pics des chromatogrammes. Des résultats non publiés par ce dernier lui permettent d'affirmer que cette méthode conduit à la détermination du pourcentage de chair d'une espèce dans un mélange de poisson ou dans de nouveaux produits (exemple: simili crabe) fabriqués à partir de filets de poisson.

Il existe un moyen indirect de mesurer la quantité de protéines solubilisées. Par gravimétrie, la fraction solide résiduelle peut être déterminée par différence de poids après un séchage des protéines de morue insolubles en solution saline. Cette technique est rapide et efficace pour mesurer les altérations des protéines. Ainsi dans le cas où la dénaturation des protéines s'avère reliée à un paramètre tel la couleur, l'opacité, le pourcentage d'eau et la teneur en sel, ce test apportera une orientation très intéressante aux producteurs dans le contrôle de la qualité du produit fini.

B - OPACITE

La littérature n'offre que très peu de documentation reliée à la mesure de l'opacité d'un aliment. A la lumière des articles scientifiques consultés, il n'apparaît que trois façons potentielles d'y arriver, soit:

1) l'usage de la densité optique,
2) l'emploi de fibres optiques
3) détermination de la transmission interne

1) La densité optique

Love (1962a) a développé une méthode qui évalue l'opacité des chairs de poisson. Cette technique mesure la turbidité d'une solution de tissu broyé en suspension. Cela permet de vérifier les modifications protéiques retrouvées dans le muscle après la congélation. L'utilisation de ce moyen apparaît être une direction éventuelle à exploiter dans l'étude de l'opacité et de la dénaturation protéique du Gaspé Cure.

2) Les fibres optiques

Le prototype d'un instrument à fibres optique a été développé dans le but de détecter la translucidité des viandes (figure 8). L'appareil donne une réponse en regard de l'importance de la diffusion de la lumière par les particules du muscle. Cet appareil robuste est conçu pour une utilisation simple et rapide dans l'industrie. Il consiste en une sonde à extrémité tranchante fixée à une poignée qui est introduite dans la viande. En général, le muscle choisi est le M. longissimus dorsi. C'est un muscle dorsal qui longe la colonne

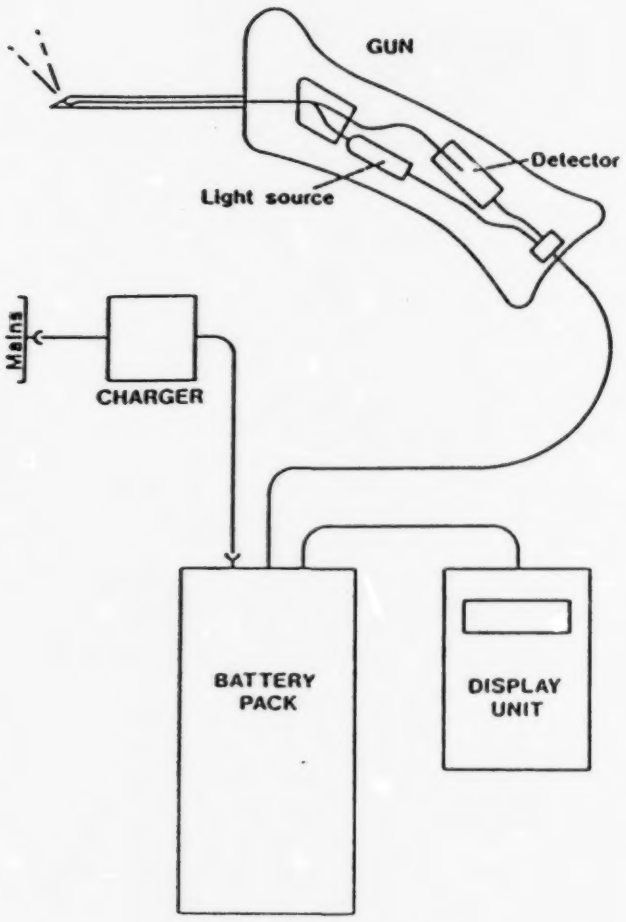

Figure 8. Diagramme de la sonde à fibre optique MRI (MacDougall, 1980).

vertébrale. L'énergie de l'instrument est fournie par une pile rechargeable. La réponse transmise à un amplificateur apparaît sur un écran digital et s'exprime par des valeurs relatives de 20 à 60. Il existe une relation linéaire entre les valeurs et le coefficient de diffusion (s) défini plus loin. Ce paramètre mathématique développé par Kubelka et Munk (1931) décrit adéquatement les propriétés de diffusion de la lumière de la viande crue (MacDougall, 1980). Ce dernier met en évidence cette relation lors de travaux portant sur le boeuf et obtient un coefficient de corrélation de 0,93 (figure 9).

3. La transmittance interne

L'analyse de Kubekla et Munk (1931) reprise par Francis (1975) est largement utilisée dans l'industrie des peintures afin de vérifier les mélanges de couleurs. Il a été démontré pour des échantillons opaques, que le rapport entre la fraction de la lumière absorbée par le tissu (K) et la fraction diffusée dans toutes les directions dans ce même tissu (S) est proportionnelle à la concentration du colorant dans l'échantillon.

Certaines études (Huang, 1970a,b; Gullett, 1971) montrent l'existence d'une relation entre K/S et la réflectance par l'équation 2.

$$K/S = \frac{(1-R\alpha)^2}{2R\alpha} \qquad \text{(équation 2)}$$

où $R\alpha$: la réflectance à l'épaisseur à l'infini de l'échantillon. Les mesures de la réflectance s'expriment en unité relative qui sont spécifiques a chaque appareil.

La perception visuelle d'un aliment dépend de ce que subit la lumière incidente. Cette lumière reçue par un matériel turbide est à la fois diffusée, absorbée, transmise et réfléchie. Un spectrophotomètre ou un réflectomètre mesure l'énergie d'une radiation diminuée par rapport à une source lumineuse incidente. Cependant, l'énergie

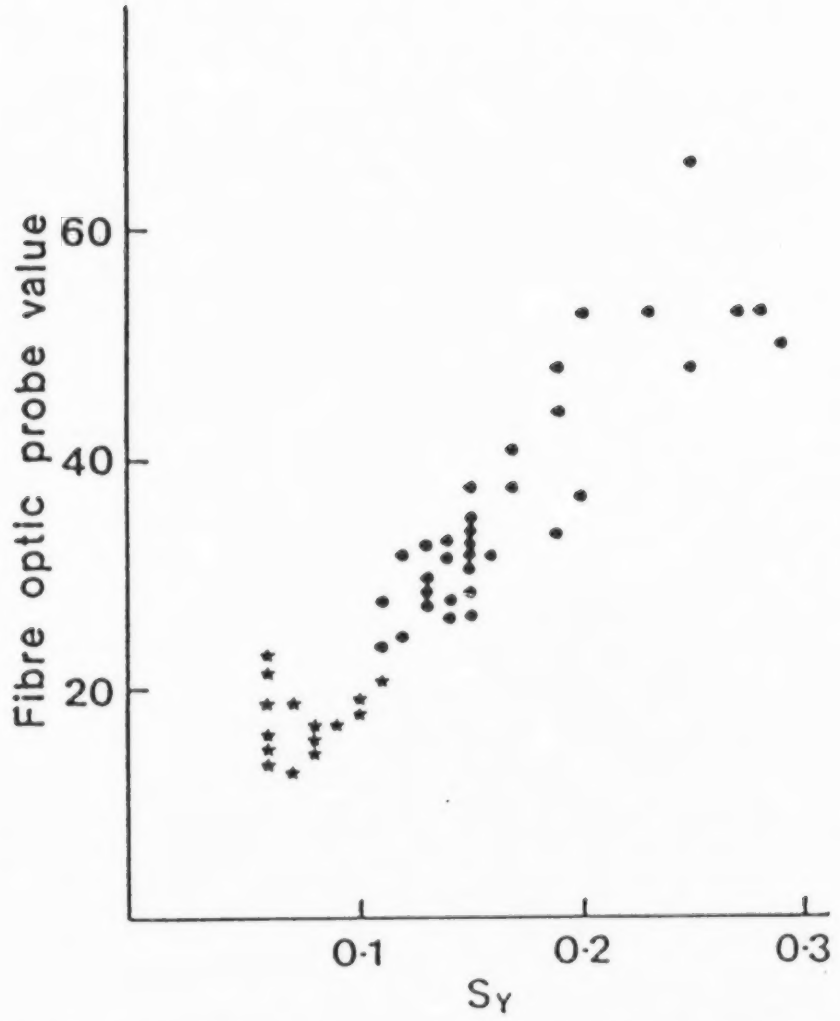

Figure 9. Relation entre la valeur de la sonde à fibre optique et le coefficient de diffusion de la lumière (S_y) pour une coupe de boeuf foncé (S_y < 0,11), normal (0,11 < S_y < 0,18) et pâle (S_y ≥ 0,2) (MacDougall, 1980).

- ● pH du muscle ≤ 5,9
- ★ pH du muscle ≥ 6,0

mesurée ne correspond pas à une valeur absolue de l'absorption du matériel due au phénomène de diffusion de la lumière (Light scattering). Les instruments, de même que l'oeil, ne peuvent évaluer l'absorption et la diffusion individuellement.

Le concept de Kubelka et Munk propose une solution à ce problème en tenant compte à la fois de la réflexion, de la transmission, de l'absorption des couches de surface et de la diffusion de la lumière. Après des manipulations de l'aliment translucide décrites ultérieurement, les transformations mathématiques de la réflexion mesurée permettent de calculer la densité optique (log $(1/T_i)$) de l'aliment composé de deux effets importants: l'absorption et la diffusion (Francis, 1975).

L'échantillon découpé en minces tranches formant des couches quasi transparentes, est déposé dans une cellule de verre optique et trois mesures instrumentales sont relevées:

1) R est la réflectance de la tranche avec un arrière-plan de couleur blanche

2) Ro est la réflectance de la tranche avec un arrière-plan de couleur noire

3) Rg est la réflectance de la l'arrière-plan blanc seul, celui utilisé pour déterminer R.

La figure 10 représente les trois installations requises pour la mesure de R, Ro et Rg.

Le logarithme de la réciproque de la transmittance interne (Ti) de la tranche de l'aliment analysé représente l'abondance des solutions claires. Il s'obtient par les formules suivantes (équations 3 et 4):

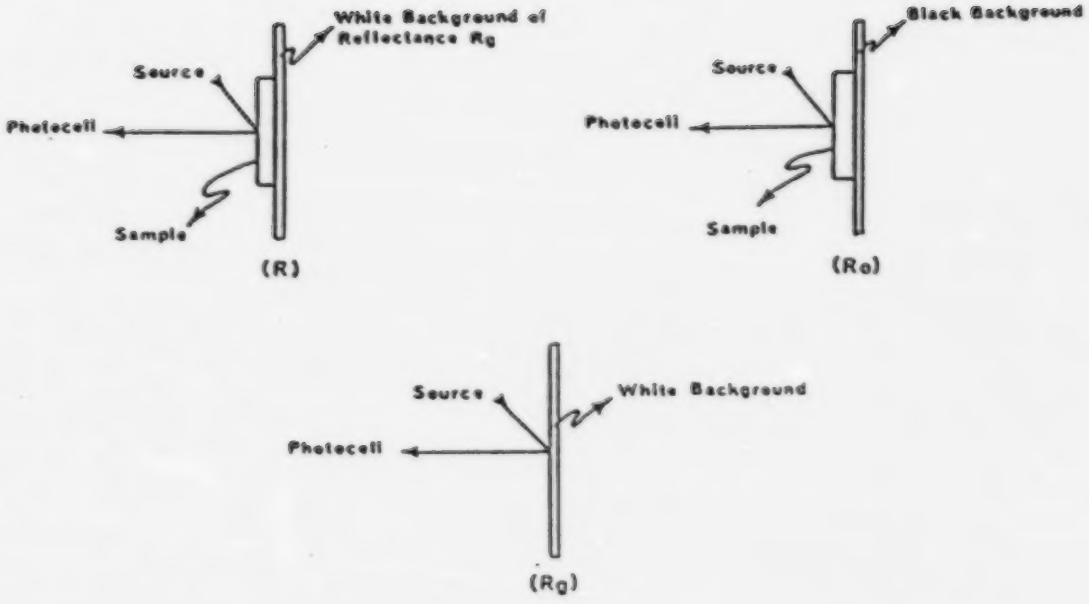

Figure 10. Description des mesures impliquées par l'application de la théorie de Kubelka et Munk (1931) sur la translucidité (Francis, 1975).

$$Ti = (R-Ro)\ (1/Rg-Ro) \qquad \text{(équation 3)}$$

$$D.O.\ \text{milieu turbide} = \log\ (1/Ti) \qquad \text{(équation 4)}$$

Cette fonction (Eq. 4) représente une mesure directement proportionnelle au changement d'un milieu turbide. Cette valeur est analogue à la D.O. dans les vraies solutions et ainsi doit se conformer à la loi de Beer-Lambert, laquelle met en relation directe la D.O. et la concentration. De ce fait, log (1/Ti) est en relation directe avec l'impact visuel total, i.e. les effets de la combinaison de l'absorption et de diffraction.

MacDougall (1970), Francis (1975), Gullett (1971) et Huang (1970a, b) proposent de substituer les valeurs des tristimulus (X,Y,Z) ou de l'échelle Hunter (L,a,b) au valeurs de la réflectance dans les équations de Kubelka-Munk. Trois données sont obtenues de la même manière que dans le cas de la réflectance.

1) X est un des tristimulis de la tranche musculaire avec un arrière-plan blanc
2) Xo est un des tristimulis de la tranche musculaire avec un arrière-plan noir
3) Xg est un des tristimulis de l'arrière-plan blanc, seul.

D'une façon similaire, la transmittance interne et la densité optique peuvent être déterminées à partir de Y, Yo et Yg; Z, Zo et Zg, L, Lo et Lg ou de tous les autres valeurs de tristimulis.

Les calculs de TiY, TiZ, TiL, etc. sont tout aussi acceptables. La transmittance interne est la fraction de lumière qui passe à travers la tranche et par le fait même, une mesure inverse de l'opacité. Les résultats de MacDougall (1970) montrent qu'une relation inversement proportionnelle relie la Ti et l'épaisseur. Ainsi, une augmentation de l'opacité se traduit par une Ti tendant vers zéro.

Les mesures de K et S peuvent devenir extrêmement intéressantes car ce rapport permet d'estimer la concentration d'un colorant.

L'emploi des paramètres a et b permet de calculer K et S selon Judd (1975)

a) Calcul du coefficient de diffusion (S)

$$Sx = \frac{1}{b} \text{ arc cotgh } \frac{1-aXo}{bXo} \qquad \text{(équation 5)}$$

$$S = \frac{1}{x} \frac{1}{b} \text{ arc cotgh } \frac{1-aXo}{bXo} = [mm^{-1}] \qquad \text{(équation 6)}$$

où x = épaisseur de la tranche = [mm]
Sx = coefficient de diffusion tenant compte de l'épaisseur

$$a = \frac{1}{2} X + \frac{(Xo-X-Xg)}{XoXg} \quad \text{(Francis, 1975; Huang, 1970a,b)} \quad \text{(équation 7)}$$

$$b = (a^2-1)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{(équation 8)}$$

b) Calcul du coefficient d'absorption (K)

$$K = S\,(a-1) = [mm^{-1}] \qquad \text{(Equation 9)}$$

Cette méthode possède le double avantage de mesurer à la fois l'opacité et la concentration de la couleur. Quelques auteurs dont Huang (1970a, b) montrent la linéarité du phénomène reliant la concentration et le rapport K/S. Ils obtiendront des coefficients de corrélation de l'ordre de 0,9 avec l'échelle Lab de Hunter.

Cette théorie développée par Lubella et Munk s'emploie dans le domaine alimentaire. Elle permet de vérifier la coloration des courges ou des carottes en purée (Huang 1970a, b) et de détecter l'intensité du brunissement du lait écrémé et des sauces aux pommes (Francis, 1975).

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La procédure expérimentale lors de la cueillette des échantillons est donnée au schéma 1 et le traitement détaillé de chacun des échantillons donnés au schéma 2. Ces échantillons sont prélevés à différentes étapes lors du procédé de fabrication de la morue légèrement salée séchée de type Gaspe Cure.

Détermination des protéines

a) Méthode de Biuret:

Une modification est apportée au protocole décrit par Anonyme (1982). La construction de la courbe standard s'effectue à partir de l'albubine de sérum bovin (B.S.A.) au lieu de la caséine.

b) Méthode de Lowry:

La description intégrale de la méthode est donnée par Anonyme (1982).

c) Micro Kjeldahl:

Le protocole utilisé est décrit par Anonyme (1982).

d) Absorption à 280 nm

L'extrait protéique est dilué pour obtenir une absorbance de la solution se situant entre 0,2 et 1,0 (unité densité optique). Une cuvette de quartz est utilisée lors de la lecture au spectrophotomètre (Diode Array spectrophotometer No HP 8451A, Hewlett Packard),

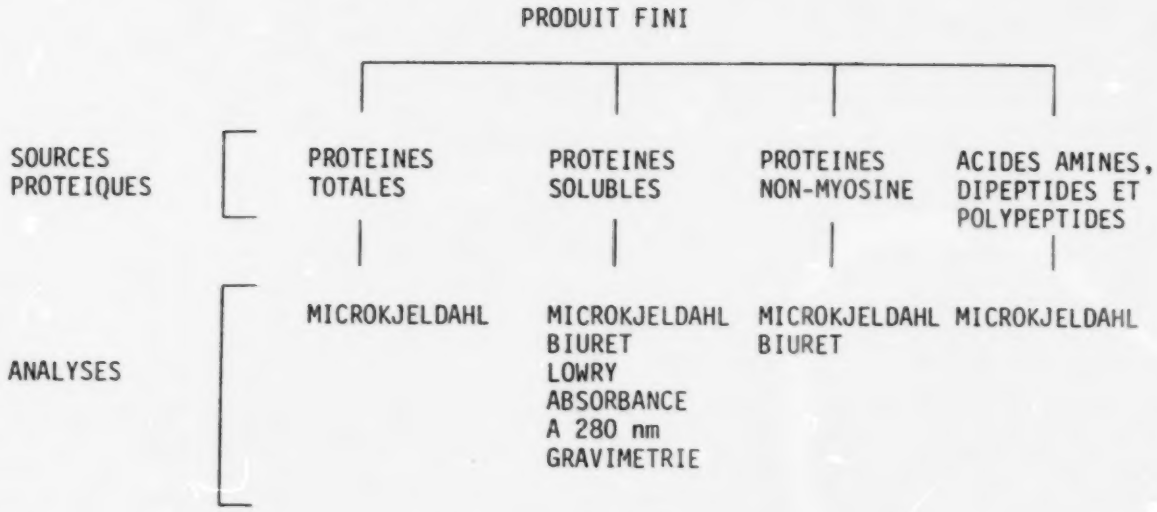

Schéma 1: Procédure expérimentale

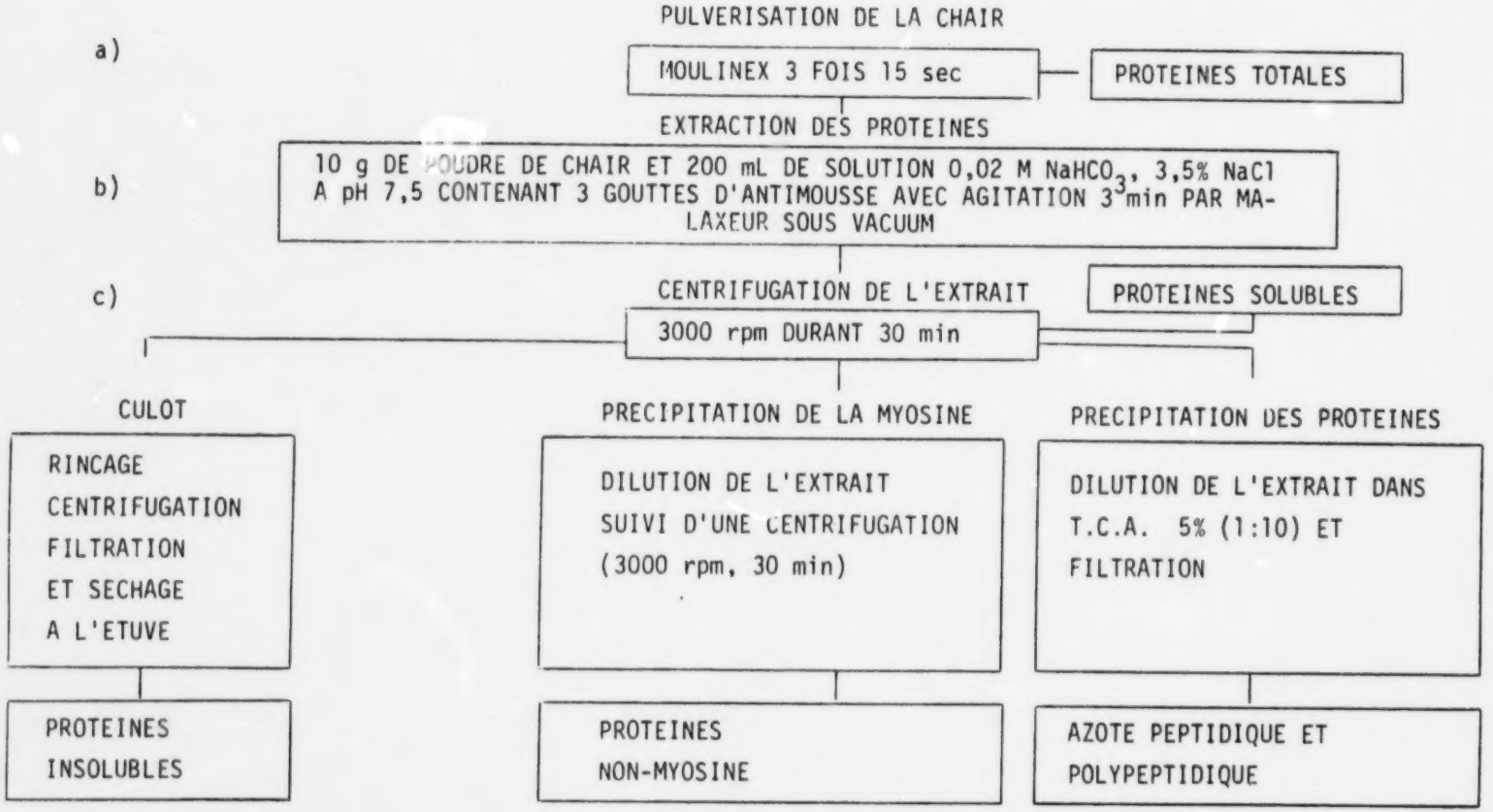

Schéma 2: Traitement de l'échantillon au laboratoire

Les résultats sont comparés à une courbe standard dont la protéine de référence est la B.S.A. L'équation de la courbe est établie par régression linéaire et après modifications, exprimée par l'équation

$$\frac{\text{g de protéine}}{\text{100 g de chair}} = \frac{(\text{densité ioptique} - 0{,}001577)}{41{,}448241} \times 6{,}25 \qquad \text{(Equation 10)}$$

e) Gravimétrie

Les fibres récupérées sont diluées 2 fois avec un volume d'eau déionisée égal à celui de l'extraction (200 mL), permettant un rinçage efficace. Après centrifugation (30 min à 3 000 rpm), l'extrait obtenu en C (schéma 2) est filtré sur papier filtre Whatman No 1 préalablement pesé. Les fibres et le papier filtre sont placés à l'étuve ventilée 48 heures à 85°C. Par différence, on obtient le poids sec des protéines résiduelles insolubles en solution saline.

La teneur en protéines solubles est calculée à partir de l'équation 11:

$$\frac{A-B}{A} \times 100 = C \qquad \text{(Equation 11)}$$

où A = masse de protéines totales (g)
B = masse de protéines insolubles (g)
C = % de protéines solubles (g/100 g)

L'obtention de la teneur en protéines totales (A) nécessite la détermination des teneurs initiales en eau et en sel.

f) Teneur en sel:

L'extraction du sel est effectuée selon la méthode proposée par Pomerleau et Picard (1985). Les dosages sont réalisés à l'aide du Salt Analyser model 1100 (Diamond Crystal Salt Company, St-Clair, Mich.).

g) Colorimétrie et opacité:

Six mesures de couleur sont obtenues sur le produit intact en utilisant le colorimètre XL-1000 (Pacific Scientific, Montréal). La mise au point de la préparation des échantillons pour les analyses d'opacité n'est pas complétée, mais l'appareil utilisé est le même.

3. RESULTATS ET DUSCUSSION

Les effets de certains composés sur l'absorption de la longueur d'onde à 280 nm sont mesurés sur trois solutions présentées au tableau 5. Les résultats révèlent que ni l'ion chlorure ni l'ion sodium n'absorbent à cette longueur d'onde. Donc, on présume que leur usage n'influencerait pas la détermination des concentrations en protéines des échantillons. Cependant, l'acide trichloroacétique (TCA) et l'antimousse (Sigma Chemical Co., No A-5758) absorbent à 280 mn.

Ils entrainent une légère surévaluation de la densité optique. L'absorbance des extraits doit donc être soustraite d'une valeur de 0,05 éliminant ainsi l'effet de ces constituants.

Tableau 5. Evaluation du potentiel d'absorption à 280 nm de quelques solutions

Solution	A_{280}
TCA 5%	0,048
NaCl 26%	0,003
Antimousse (3%)	0,049

La solubilisation des protéines est obtenue à l'aide d'une solution d'extraction composée de 3,5% NaCl et de quelques gouttes d'antimousse. Les documents consultés jusqu'à maintenant ne mentionnent pas que ces composés chimiques entrainent des artéfacts dans les tests colorimétriques (Biuret, Lowry). Afin d'en vérifier les effets, des courbes standards obtenues à partir de solutions aqueuses de sel et/ou d'antimousse sont établies. L'équation de chacune des droites est obtenue par régression linéaire pour les analyses par Biuret et Lowry (tableau 6).

TABLEAU 6. Effet du NaCl et de l'antimousse contenu dans la solution d'extraction sur les mesures obtenues par Biuret et Lowry

Analyse	Nature du solvant	Equation[1]		Coefficient de corrélation (%)	Coefficient de variation moyen (%)
		m	b		
Biuret	Eau	0,05022	0,0184	99,94	2,06
	Eau et 3,5% NaCl[2]	0,04956	0,0201	99,92	2,20
	Eau et AM[3]	0,05050	0,0224	99,95	1,23
	Eau et AM et 3,5% NaCl	0,05050	0,0195	99,94	1,39
Lowry	Eau	0,00156	0,0356	99,82	0,71
	Eau et 3,5% NaCl	0,00160	0,0256	99,92	0,36
	Eau et AM	0,00152	0,0424	99,87	1,23
	Eau et AM et 3,5 NaCl	0,00153	0,0345	99,80	1,32

[1] Standard: BSA, l'équation Y = mx-b ou Y = D.O. et x = concentration

[2] A la présence de 3,5% NaCl s'assorie 0,02 M $NaHCO_3$

[3] AM: antimousse

sel de la chair (R = 95,8%). La figure 11 illustre ces deux relations. L'indice du jaune peut aussi être calculé par d'autres stimulis, par exemple, X, Y, Z. Cependant, l'emploi de l'échelle Hunter offre un avantage car le stimuli "b" reflète le caractère jaune de l'aliment. Les résultats du tableau 7 indiquent que 0,172 g de NaCl par gramme de chair accroît la concentration de sel durant l'extraction. Pour 10 g de chair de salé séché pulvérisé, il y a un apport de 1,72 g de sel dans 200 mL de solution d'extraction à 3,5% de sel (schéma 3). La concentration finale en chlorure de sodium (NaCl) de l'extraction est majorée à 4,36%, c'est-à-dire que 0,86 g de NaCl provenant d'un échantillon par/100 mL s'additionne aux 3,5% déjà contenus dans la solution diluante. Donc, les limites suggérées par Dyer (1950) sont respectées durant l'expérience.

Divers modes d'agitation ont été essayés afin de déterminer lequel est le plus efficace vis-à-vis l'extraction des protéines (schéma 3). Des essais sont entrepris pour comparer l'agitation magnétique et l'agitation par oscillation. Certains problèmes découlent de la nature du matériel à l'étude. Les fibres musculaire de la morue fraîche pulvérisée s'assemblent pour former des grumeaux pâteux qui se solubilisent très difficilement occasionnant des résultats incohérents. Lors de l'extraction des protéines solubles de la morue fraiche sur plaque oscillante (Fisher Oscillating Hot Plate, Model 11-492-10) l'extrait contient plus de protéines solubles (10,6%) à 30 minutes qu'après 4 heures d'agitation (tableau 8). Cet effet s'observe aussi pour l'agitation magnétique (Lab-Line, Multimagnetir, No-1278) où la concentration protéique de l'extrait de la morue fraîche après une heure est moins important qu'après 30 minutes. Avec le produit fini pulvérisé, cette dernière stimule la mise en solution car 2 heures seulement sont requises pour l'extraction d'environ 23,5% de protéines contrairement à 4 heures par agitation oscillante. La vitesse d'extraction est fonction de la surface de contact qu'offre la chair à la solution. La petitesse des granules de chair rend de plus en plus performante l'extraction des matières solubles. Ces deux modes d'extraction par agitation modérée, éliminent l'effet indésirable du moussage

Une très faible variabilité des résultats est mise en évidence. Une variation de 2% est obtenue pour l'ensemble des courbes du Biuret et moins de 2% dans le cas de Lowry. Ces résultats dénotent une bonne mise au point des protocoles analytiques et confirment l'absence d'interférence majeure provenant de l'antimousse et/ou du sel pour les échantillons expérimentaux. L'expérience a de plus démontré que la réussite de ces analyses dépend de la fraîcheur des solutions de protéines. La fraîcheur du réactif "C" (mélange de bicarbonate de sodium, de sulfate de cuivre et de citrate de sodium) impliqué dans la réaction de Lowry est un facteur qui limite le succès du test de Lowry.

Les travaux de Dyer (1950) démontrent que la dissolution des protéines de la morue varie avec la composition du sel et leur concentration dans la solution d'extraction. L'auteur souligne que la quantité maximale de protéines solubles extraite s'obtient aux concentrations de 3 à 5% NaCl. Puisque le Gaspé Cure est une denrée alimentaire possédant une teneur en sel élevée, la mesure de ce composé dans le tissu s'avère un point essentiel de la vérification du respect des limites établies par Dyer (1950) pendant l'extraction. Le tableau 7 renferme les analyses de quelques constituants et de la couleur de la chair de morue aux différentes étapes de sa transformation en Gaspé Cure.

L'indice du jaune (Yellowness Index) exprime la coloration sous la forme d'une valeur calculée à partir de trois stimulis de l'échelle de Hunter (Manuel Gardner Automatic Color Difference Meter, série 200, modèle AC-2A).

$$\text{Yellowness Index (Y.I.)} = \frac{71{,}53a + 178{,}82b}{L} \qquad \text{(Equation 12)}$$

Des courbes de régression linéaire, il apparaît que le Y.I. est étroitement relié au pourcentage d'eau présent dans le produit (R= 95,9%) et à la sommation des autres constituants, les protéines et le

TABLEAU 7. Quelques caractéristiques de la morue pendant sa transformation en Gaspe Cure

Etape de la transformation	Eau (%)	Sel[1] (%)	Protéine[1] (%)	Indice du jaune (Y.I.)
Fraîche	82,0	0,04	18,8	14,25
Saumurée	74,6	7,50	17,9	17,95
Légèrement séchée	65,9	10,10	24,0	30,19
Moyennement séchée	57,3	14,10	28,6	28,73
Produit fini	45,0	17,20	37,8	38,93

[1] Les résultats de sel et de protéines s'expriment sur une base humide.

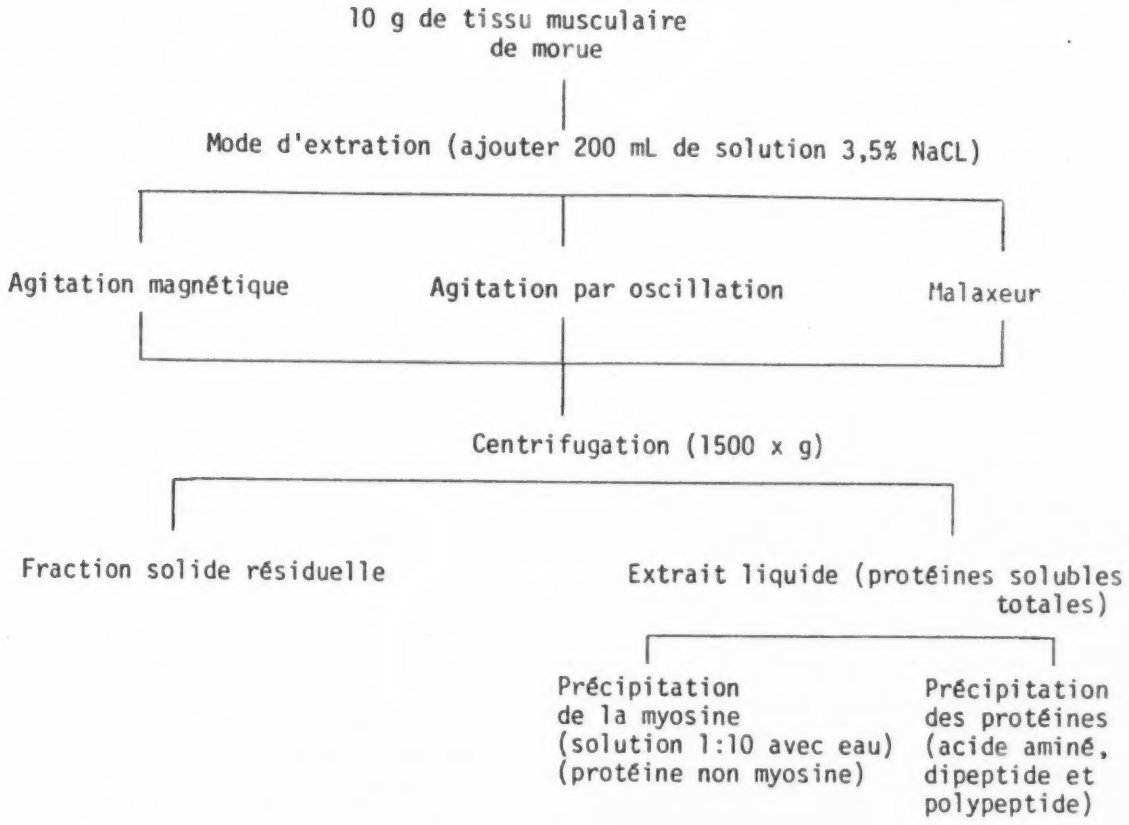

Schéma 3. Synthèse des modes d'extraction des protéines exercés durant les travaux de laboratoire et de traitement de l'extrait.

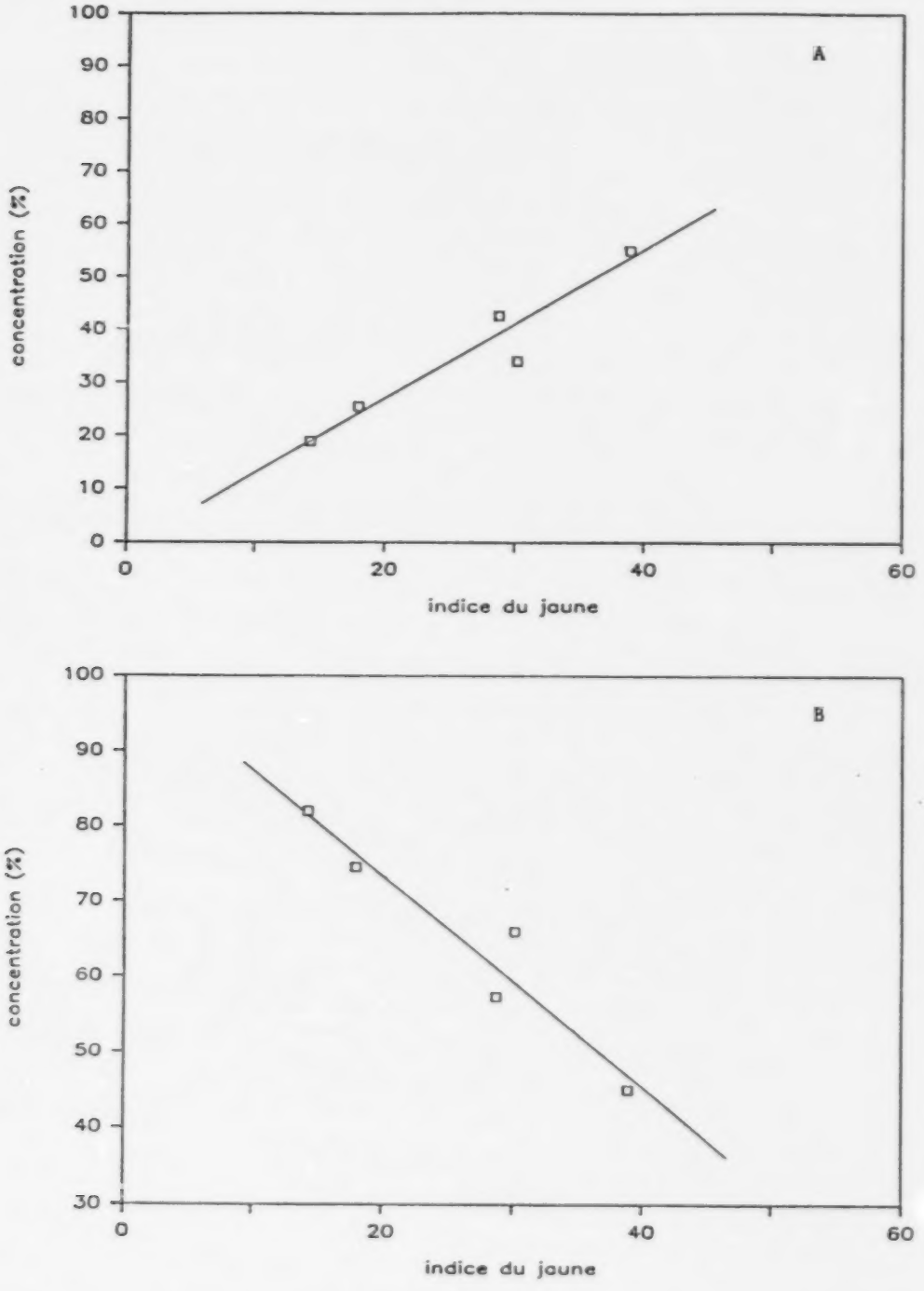

Figure 11. Relation de l'indice du jaune en fonction (A) de la teneur en matière sèche et (B) de la teneur en eau de la chair durant la transformation du Gaspe Cure.

TABLEAU 8. Comparaison de deux modes d'agitation durant l'extraction des protéines de la chair de morue à 23°C[1]

Temps (h)	% de protéines solubles totales dans une solution de 3 à 5% NaCl			
	agitation magnétique		Agitation par oscillation	
	Fraîche	Salée séchée	Fraîche	salée séchée
0,5	25,0	20,7	10,6	-[2]
1,0	18,9	21,0	-	-
2,0	30,6	23,2	-	-
4,0	34,4	26,0	7,2	23,8

[1] La quantité de protéines des extraits est dosée par le Biuret et exprimée sur une base de protéines totales du muscle ou 18% et 31,4% représentent les pourcentages.

[2] Aucune valeur (problème technique).

durant l'extraction. Cependant, il ne fait aucun doute que l'agitation magnétique est plus efficace.

Abstraction faite des résultats obtenus après une heure d'extraction par agitation magnétique, la différence entre les concentrations en protéines solubles des deux modes s'accroît au fur et à mesure que l'extraction se poursuit. Elle passe de 4,3% à 8,4% de 30 minutes à 4 heures. Il y a lieu de croire que prolonger l'agitation aurait des effets bénéfiques quant à l'observation des conséquences de la transformation de la morue en Gaspe Cure sur la dénaturation des protéines. Cependant, les conditions d'opération se prêtent à l'altération microbienne et enzymatique ce qui implique que rallonger la période d'extraction risque d'entrainer d'autres artéfacts.

La spécificité des réactions du Biuret et de Lowry entraine des estimations différentes de la proportion des protéines qui constituent l'extrait aqueux (Tableau 9). En considérant le micro-kjeldahl comme test de référence, le Biuret sous-estime les protéines. Il en est de même pour Lowry. Les résultats rapportent que cette variation est supérieure pour le test de Lowry mais diminue dans les deux cas avec la durée de l'extraction. Ces écarts de résultats du tableau 9 se retrouvent dans le tableau 10, dans le même ordre de grandeur sur l'extrait d'un autre échantillon de poisson. Il semble que l'usage d'un malaxeur sous vacuum avec agitation de 3 minutes permet d'obtenir des résultats comparables à l'agitation magnétique durant 0,5 heures. Le dosage par Lowry et Biuret s'éloigne du micro-kjeldahl de 40 à 45% et 35 à 40% respectivement dans les deux types d'extraction (tableau 9).

Etant donné l'inaptitude de l'agitation magnétique à triturer la chair fraîche, l'utilisation du malaxeur sous vacuum s'avère un moyen avantageux d'y remédier. Le vacuum permet de refroidir rapidement le mélange, diminuant ainsi les risques de changements de la matière soluble causés par l'activité enzymatique et microbiologique, et de réduire considérablement l'incorporation d'air ainsi que le moussage des protéines solubilisées. Les résultats du

TABLEAU 9. Dosage des protéines de "Gaspe Cure" par plusieurs méthodes d'analyse (Extraction par agitation magnétique)

Temps (h)	% de protéines[1]			Variation par rapport au microkjeldahl (%)	
	Biuret	Lowry	Microkjeldahl	Biuret	Lowry
0,5	16,5	15,1	25,7	35,8	41,2
1	18,9	17,6	26,9	29,7	34,6
4	25,4	22,9	32,5	21,8	29,5

[1] Les résultats s'expriment en g protéines solubles totales/100 g de protéines totales dans le muscle.

TABLEAU 10. Concentration des constituants protéiques contenus dans des extraits de Gaspe Cure mesurée par diverses méthodes d'analyse.

Constituant analysé	Méthode d'analyse	% de protéines[1]		Variation (%)
		Agitation magnétique (0,5 h)	Malaxeur sous vacuum agitation de 3 min	
Protéines solubles totales	Biuret	16,5	15,7	4,8
	Lowry	15,2	14,0	7,9
	Microkjeldahl	25,7	23,8	7,4
	Absorbance à 280	27,1	25,5	5,9
	Fraction solide réduelle	19,6	17,5	10,7
Protéine non-myosine	Biuret	13,7	12,6	8,0
	Microkjeldahl	24,9	23,5	5,6
Acide aminé, dipeptides et polypeptides	Microkjeldahl	7,6	12,7	40,2
Matière protéique insoluble et autres	Fraction solide résiduelle	69,9	71,99	2,9

[1] Les résultats s'expriment en g protéines solubles totales/100 g protéines totales dans le muscle.

tableau 10 montrent que l'utilisation du malaxeur par rapport à l'agitation magnétique, dévalue de 5 à 10% la proportion des protéines totales solubilisées, dépendamment du test choisi. De plus, les extractions sur le Gaspe Cure de 30 minutes et de 4 heures du micro-kjeldahl précisent que 20,9% des protéines supplémentaires se solubilisent pendant les 3 heures et demi (tableau 5). Le broyage au malaxeur dévalue la quantité totale de protéines extractibles. En réalité, cette dernière devrait se situer entre 26,9 et 30,9%

Les résultats du tableau 10 proposent qu'un seul type d'analyse surévalue la concentration de protéines solubles totales. En effet, l'absorbance à 280 nm rehausse la valeur du micro-kjeldhal de 2% approximativement. Les trois autres méthodes de dosage sous-estiment la valeur du test de référence. Les différences observées sont de l'ordre de 10,2%, 8,7% et 6,2% pour les mesures par Lowry, Biuret et la mesure des solides totaux résiduels, respectivement. La différence associée au Biuret peut être attribuable aux acides aminés et aux dipeptides qui constituent en partie, la solution aqueuse. Curieusement, la gravimétrie, une méthode simple de pesée apparait comme une des analyses les plus justes. Cette dernière ne dépend d'aucune réaction chimique, cependant elle exige des manipulations minutieuses.

Plusieurs fractions protéiques constituent l'extrait. Dyer (1950) mentionne qu'environ 80% représente la myosine tandis que le reste se compose de la globuline X, du myogène et de la myoalbumine. Il rapporte que 95% des protéines totales se solubilisent dans le cas d'un filet frais. Les résultats du tableau 10 révèlent qu'approximativement 24% des protéines totales peuvent être extraites. Ainsi, la différence, c'est-à-dire environ 70%, donne un aperçu général de l'importance de la dénaturation des protéines du Gaspe Cure.

La myosine subit une dégradation significative lors de la transformation en morue légèrement salée. Une correction des concentrations de myosine doit être apportée puisque dans les conditions expérimentales, 88% précipitent (Dyer, 1950). Selon le mode d'extrac-

tion, les résultats de l'analyse par micro-kheldahl revèlent qu'environ 0,6% des protéines solubles totales représentent la myosine (tableau 10). Le Biuret montre plutôt une différence de l'ordre de 3,4%, par exemple 16,5% comparativement à 13,7%. En supposant que notre mode d'extraction est relativement similaire a celui de Dyer (1950), les résultats, reportés sur une base de protéines totales contenue dans le muscle, sont environ de 0,8% pour le micro-kjeldahl et 4,5% pour le Biuret. D'après les données de Dyer (1950), la proportion maximale de la myosine précipitée par rapport aux protéines totales du muscle est de 66,88%. Ainsi, la dénaturation de cette fraction protéique durant la transformation du Gaspe Cure est de l'ordre de 66% et 62% respectivement d'après les analyses du micro-kjeldahl et du Biuret.

Lors de l'analyse des protéines non myosine, une différence de 11 unités de pourcent a été notée entre les méthodes de Biuret et du micro-kjeldahl. Ceci démontre clairement la grande proportion des peptides et des acides aminés présents dans la phase soluble. Cette grande variation devrait en principe se retrouver dans l'analyse des acides aminés, des dipeptides et des polypeptides.

Lors de l'extraction par agitation mécanique, 7,6% du total protéique est composé d'acides aminés, de dipeptides et de polypeptides ce qui n'explique qu'une partie de l'écart de 11 unités de pourcent obtenue par le micro-kjeldahl. La portion manquante peut s'expliquer par les bases volatiles azotées totales telles: l'ammoniaque, l'oxyde de trimethylamine et ses dérivés. L'usage d'un malaxeur sous vacuum voit cette valeur majorée à 12,7%. La contribution des acides aminés libres et des dipeptides est totale et l'excédent, c'est-à-dire environ 2% provient des polypeptides de 3 à 50 unités et moins qui ne précipitent pas lors de l'acidification par l'acide trichloroacétique. Ces résultats suggèrent que l'agitation magnétique à température de la pièce amène des modifications de la matière protéique à l'étude. Le travail des enzymes et organismes protéolytiques s'avère une source éventuelle d'altérations néfastes aux renseignements désirés par cette étude.

Il est intéressant de noter que l'addition des protéines solubles totales et de la matière protéique insoluble permet d'évaluer la justesse de l'ensemble des opérations. Théoriquement, l'addition égalerait 100%. Cependant, des pertes de 4,4% et 4,2% sont enregistrées puisque 95,6% et 95,8% sont les sommations des résultats obtenus pour les extraits solubles et insolubles avec l'agitation magnétique et le malaxeur respectivement. Une mesure des protéines insolubles par le micro-kjeldahl pourrait nous permettre de justifier la précision des manipulations reliées au test de gravimétrie. A l'heure actuelle, l'imprécision de cette méthode pourrait expliquer en partie ou en totalité les pertes observées. L'évaporation de substances azotées volatiles demeure un facteur difficulement contrôlable et quantifiable par notre procédure expérimentale, mais il pourrait être responsable d'une fraction assez considérable de protéines manquantes.

Jusqu'à maintenant, une esquisse du portrait de la matière azotée du Gaspe Cure peut être proposée. Bien que sommaires, ces résultats décrivent les sources d'azote inhérentes au muscle de morue salée et séchée (schéma 4).

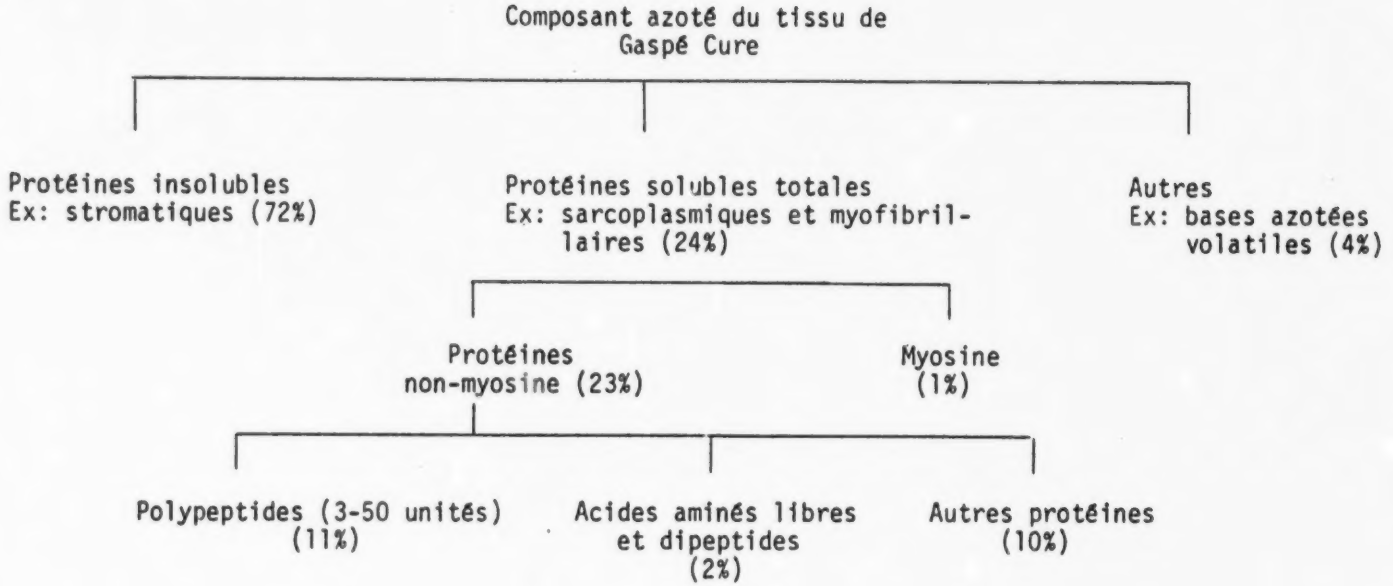

Schéma 4. Répartition de la matière azotée du Gaspé Cure

4. CONCLUSION

Vraisemblablement, le phénomène d'opacité pourrait être relié aux modifications des protéines car ces dernières constituent la deuxième composante importante de la morue salée séchée. Cependant, l'évaluation de la dégradation des protéines exige une préparation minutieuse au laboratoire. Certains instruments spéciaux et sophistiqués sont indispensables au déroulement des opérations, par exemple le spectrophotomètre, une cuve à électrophorèse sur gel, etc.

Toutes les manipulations requises pour le dosage des protéines et des matières azotées sont parfaitement contrôlées par le laboratoire actuel. Seules les méthodes de mesure de l'opacité et d'identification sont à parfaire afin d'atteindre l'objectif qui est d'établir une corrélation entre l'opacité du produit et le phénomène de dénaturation de ces protéines.

A partir des renseignements retrouvés dans la littérature, une voie est à envisager dans la poursuite de cette expérience. L'étude du fractionnement des protéines fibrillaires par migration sur gel s'avère essentielle dans la compréhension du phénomène de dégradation protéique caractéristique de la morue salée séchée.

L'établissement d'une technique et d'un appareil capables d'évaluer la translucidité du produit serait de bon augure dans l'élaboration du système de contrôle de la production de l'industrie du salé séché. Ce type d'instrument serait, sans aucun doute, bénéfique aux producteurs permettant d'obtenir une méthode d'évaluation rapide. De plus, si la technique développée utilise le concept de Kubelka et Munk, la littérature permet de croire que le producteur serait du même coup capable de déterminer l'opacité et la concentration du(des) pigment(s) qui pourrait constituer la coloration de son produit. Cependant, il serait nécessaire d'explorer préalablement ou simultanément le secteur de la pigmentation afin d'en connaître davan-

tage au sujet de leur nature, leur provenance et éventuellement de réussir à contrôler leurs manifestations.

Afin d'établir avec plus de précision le profil de la matière azotée aux différentes étapes de la transformation, le schéma suivant est proposé et fortement recommandé. Des analyses de la couleur y sont incluses permettant d'établir des relations intéressantes aux fins de l'objectif général poursuivi.

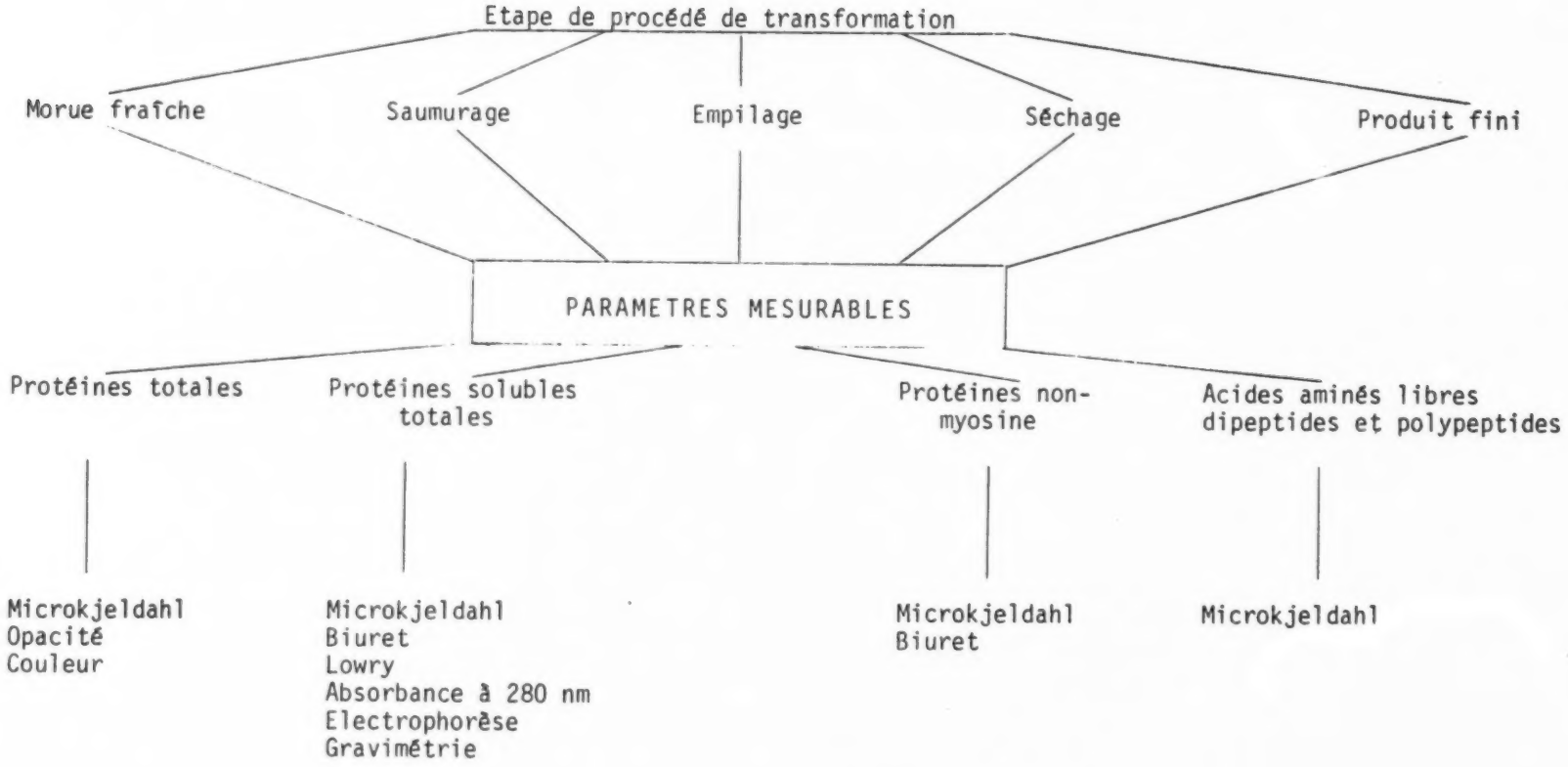

Schéma 5: Protocole expérimental recommandé

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMS, R., R. Vebekem et J. Van Hoff. 1984. Fish species identification by isoelectric focusing applied to trade products, Fleishwirtsh. 64(5) 597-598, 622-624.

ALVAREZ, P. et E.Y.J. Simal. 1974. Application of polyacrylamide gel electrophoresis to idenification of fish products: fillets and breaded portions. Annales de Bromatologia 26(2): 103-127.

ANON. 1982. Méthodes analytiques recommandées. Cahier des méthodes d'analyses en technologie des aliments, p. 0/1 - p. 8/6.

ASHOOR, S.H. et M.J. Knox. 1985. Identification of fish species by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 324, 199-202.

BEATTY, S.A. et Fougère. 1958. La préparation du poisson salé séché. Office de la recherche en pêcheries du Canada. Bulletin no 112.

BENSADOUN, A. et D. Weinstein. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem, 70, 241-250.

BILLON, J., S.H. Tao et N. Olfieuz. 1979. Identification électrophorétique des espèces de poissons. RTVA 18(154) 17-20.

CHEFTEL, J.C. et H. Cheftel. 1976. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Entreprise Moderne d'Édition, Paris, Vol. 1, 63-73.

COLOWICK, S.P. et D.O. Kaplan. 1957. Methods in enzymology, No III, Academic Press Inc., New York.

CONNELL, J.J. 1953a. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. 1. Electrophoretic analysis of codling extracts of low ionic strength. Biochemical Journal 54, 119-126.

CONNELL, J.J. 1953b. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. 2. Electrophoretic analysis of low ionic strength extracts of several species of fish. Biochemical Journal, 55, 378-388.

DEMAN, J.M. 1976. Principles of food chemistry. The AVI publishing company, Inc., Westport, Connecticut, 121-122.

DYER, W.J., H.V. French et J.M. Snow. 1950. Proteins in fish muscle. 1. Extraction of proteins fractions in fresh fish. J. Fish. Res. Bd. Can., 7(10) 585-593.

ELLIS, D.G. et P.M. Winchester. 1959. Proteins in fish muscle. 12. Ultracentrifuge studies on post-rigor extracts of structural proteins. J. Fish. Res Bd. Canada, 16(1) 33-41.

FRANCIS, F.J. et F.M. Clydesdale. 1975. Food Chemistry: Theory and applications. AVI Publishing Company Inc. Westport, Connecticut, 160-169.

GORNALL, A.C., C.J. Bardawill et M.M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177, 751-766.

GULLETT, E.A., F.J. Francis et F.M. Clydesdale. 1971. Colorimetry of Food 4. Orange Juice. J. Food Sci. 37, 389-393.

HAMES, B.D. et D. Rickwood (eds.). 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford, Washington D.C.

HAMILTON, W.D. 1982. Fish species identification by thin layer agarose isoelectric focusing and densitometric scanning. Journal of the association of officiel analytical chemists 65(1) 119-122.

HAMM, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. In: Advances in Food Research 10, p. 414-419 et 443-463.

HATTULA, T. 1978. Identification of fish species by electrophoresis. Kemia-Kemi 5(12) 632.

HUANG, I-Lo, F.J. Francis et F.M. Clydesdale. 1970a. Colorimetry of Food: 2. Color measurement of squash using the Kubelka-Munk concept. J. Food Sci. 35: 315-317.

HUANG, I-Lo, F.J. Francis et F.M. Clydesdale. 1970b. Colorimetry of Food. 3. Carrot puree. J. Food Sci. 35, 771-773.

HUME, A. et I.M. Mackie. 1980. The use of electrophoresis of the water-soluble muscle proteins in the quantitative analysis of the species components of a fish mince mixture. In: Advances in fish science and technology. Connell, J.J., Torry, R.S. (eds.). Aberdeen, Scotland, 451-456.

IRONSIDE, J.I.M. et R.M. Love. 1958. Studies on protein denaturation in frozen fish. I. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble protein present in the muscle of the North Sea cod. J. Sci. Food Agric., 9, 597-617.

JHAVERI, S.N., P.A. Karakoltsidis, J. Jr, Montecalvo et S.M. Constantinides. 1984. Chemical composition and protein quality of some Southern New England marine species. Journal of Food Science 49, 110-113.

JUDD, B.D. et G. Wyszecki. 1975. Color in business. Science and Industry (3e ed.) New York, John Wiley & Sons, Inc., 420.

KOLAKOWSKI, E. 1974. Determination of peptides in fish and fish products. Part I. Application of amido black 10B for determination of peptides in thichloroacetic acid extracts of fish meat. Die Nahrung 18(4) 371-383.

KOLODZIEJSKA, I. et Z.E. Sikoroki. 1980. Inorganic salts and extractability of fresh and frozen fish proteins. International Journal of refrigeration 3(3) 151-155.

KUBELKA, P. et F. Munk. 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Z. Tech. Physik, 12, 593-601.

KURAMOTO, Jenness, Coulter et Choi. 1959. A modification of the Harland Ashworth Method. J. Dairy Sc. 42: 28-38.

LAIRD, W.M. et I.M. Mackie. 1981. Protein changes during frozen storage of cod. Science et Technique du Froid 4, 349-356.

LAIRD, W.M., I.M. Mackie et A.H. Ritchie. 1982. Differentiation of species of fish by isoelectric focusing on agarose and polyacrylamide gels - A comparison. J. Assoc. Publ. Analysts, 20, 125-135.

LAYNE, E. 1957. Biuret Method. In Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds): Methods in enzymology. Vol. 3. New York, London: Academic Press, 450-451.

LEIM, A.H. et W.B. Scott. 1966. Fishes of the Atlantic Coast of Canada. Bulletin No 155. Fisheries Research Board of Canada, Stevenson, J.L. (ed.), Ottawa.

LIM, H.K. et N.F. Haard. 1984. Protein insolubilization in frozen greenland halibut (Reinhardtius Hippoglossoides). Journal of Biochemistry 8, 163-187.

LOVE, R.M. 1962a. Protein denaturation in frozen fish. IV. Opacity measurments on the muscle. J. Sci. Food Agric., 13, 197-220.

LOVE, R.M. et E.M. MacKay. 1962b. Protein denaturation in frozen fish. V. Development of the cell fragility method for measuring cold-storage changes in the muscle. J. Sci. Food Agric., 13, 200-212.

LOVE, R.M. 1970a. Chap. I. Towards a valid sampling technique. In: The chemical biology of fishes. Academic Press, London and New York, Vol. 1, 16-17.

LOVE, R.M. 1970b. Chap. 5. Depletion. In: The chemical biology of fishes. Academic Press, London and New York, Vol. 1, 222-224.

LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265.

LUNDSTROM, R.C. 1979. Fish species identification by thin layer isoelectric focusing. J. Assoc. Off. Anal. chem. 62(3) 624-629.

LUNDSTROM, R.C. 1980. Fish species identification by thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing collaborative study. J. Ass. Off. Anal. Chem. 63, 1, 69-73.

LUNDSTROM, R.C. 1983. Fish species identification by agarose gel isoelectric focusing: collaboration study. J. Ass. Off. Anal. Chem. 66(1): 123-127.

MACDOUGALL, D.B. 1970. Characteristics of the appearence of meat. I. The luminous absorption, scatter and internal transmittance of the lean of bacon manufactured from normal and pale pork. J. Food Agric. 21, 568-571.

MACDOUGALL, D.B. 1977. Characteristics of the appearance of meat. II. Uniform lightness and chromatographicness spacing of the lean of sliced fresh bacon. J. Sci. Food Agric. 22, 427-430.

MACDOUGALL, D.B. 1982. Changes in the colour and opacity of meat. Food Chemistry, 9: 75-88.

MACDOUGALL, D.B. et S.J. Jones. 1980. The translucency and colour defects of dark-cutting meat and their detection. In: The problem of dark cutting in beef. Hood, D.E., Tarrant, P.V. (eds). Martinus Nijhoff Publishers, Boston, London, p. 328-343.

MACKIE, I. 1979. A review of some recent applications of electrophoresis and isoelectric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. In: Advances in fish science and technology. Connell, J.J., Torry, R.S. (eds.). Aberdeen, Scotland, p. 444-451.

OHNISHI, M. et G.W. Rodger. 1979. Analysis of the salt-soluble protein fraction of cod muscle by gel filtration. In: Advances in fish science and technology. Connell, J.J., Torry, R.S. (eds). Aberdeen, Scotland, p. 422-428.

PICARD, G. Communication personnelle.

PODESZEWSKI, Z. et B. Sarzycki. 1975. Optimal preparation of starch gel for electrophoresis of fish muscle proteins. Zeszyty Naukowe, Akademic Rolnicza w Szczecinie 51, 87-98.

POMERLEAU, L. et G. Picard. 1985. Uniformisation du procédé de fabrication du Gaspé Cure. Pêches et Océans.

POULTER, R.G., D.A. Ledward, S. Godber, G. Hall et B. Rowlands. 1985. Heat stability of fish muscle proteins. Journal of Food Technology 20, 203-217.

REHBEIN, H. et R. Kundiger. 1984. Comparisons of the isoelectric focusing patterns of the sarcoplasmic proteins from red and white muscle of various fish species. Archiv Fur Fischereiwisnenschaft 35(½) 7-16.

SEKI, N. 1976. Identification of fish species by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the myofibrillar proteins. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, 42(10) 1169-1176.

SHENOUDS, S.Y.K. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. Advances in food Research 26, 275-311.

SIKORSKI, Z.E., S. Kostuch et I. Kolodziejska. 1975. Protein denaturation in frozen fish meat. Die Nahrung 19, 9-10, 997-1003.

SIKORSKI, Z.E. 1979. Structure and proteins of fish and shellfish. Part 2. In: Advances in fish science and technology. Connell, J.J., Torry, R.S. (eds). Aberdeen, Scotland, p. 78-86.

SOUDAN, F. 1955. Aspects chimiques du salage de la morue. Rev. Trav. Inst. Sci. Tech. pêches maritimes 19: 129-306.

SWINIARSKA, J. et Z. Podeszewski. 1973. Evaluation of methods for colorimetric determination of protein in fish meat extracts. Zeszyty Naukowe, Akademia Rolnicza w Szczecinie 40 (Rybactur Morokie, III) 243-250.

THOMAS, P. 1946. Chap. XVI: Substances protéiques, généralités, réactions, physico-chimie. Manuel de Biochimie, Ed. Masson, Paris, p. 225-301.

THORNE, C.J.R. 1978. Techniques for determining protein concentration. In: Techniques in protein and enzyme biochemistry. B 104, 1-18, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press.

TORTEN, J. et J.R. Whitaker. 1964. Evaluation of the Biuret and Dye-Binding methods for protein determination in meats. J. Food Sci. 29: 168.

TUGUT, H. 1979. Drawbacks in the use of the Biuret method for determination of the same protein in differently treated fish samples. Food Chemistry 4(2): 161-165.

UMEMOTO, S. 1978. A turbidimetric determination of fish muscle actomyosin with trichloroacetic acid. Bulletin of the Tokai regional fisheries research Laboratory 93, 111-116.

VAN KLAVEREN, F.W. et R. Legendre. 1965. Fish and food, Vol. 3, p. 141-144.

VENUGOPAL, V. et N.F. Lewis. 1981. Isolation of proteins from low-priced fish. Fleischwirtsch 61(9) 1368-1370, 1398-1401.

VERVACK, W., M. Vanbelle et M. Foulon. 1977. Composition en acides aminés de quelques produits de la pêche. Revue des fermentations et des industries alimentaires 32(6): 171-177.

WALKER, S. 1978. Methods for the determination of serum total protein. Can. J. Medic. Technol. 40: D-68.

WARRIER, S.B.K., M.S. Gore et U.M. Kumta. 1975. Fish muscle structural proteins. Fishery Technology 12(1) 1-15.